

Synthetische Dipeptidbausteine zur Stabilisierung der Struktur von Proteinen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
dem
Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Björn Eckhardt
aus Eibelshausen

Marburg / Lahn 2009

Vom Fachbereich Chemie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen am 26.08.2009.

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. Armin Geyer

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Lars-Oliver Essen

Tag der mündlichen Prüfung am 04.09.2009.

Der experimentelle Teil dieser Arbeit entstand in der Zeit von September 2006 bis März 2009 am Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg.

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Dr. Armin Geyer

für die Überlassung des sehr interessanten und vielseitigen Themas, für alle Anregungen und Gespräche im Bezug auf diese Arbeit und darüber hinaus, sowie für die wissenschaftliche Freiheit, die er mir seitens der vorliegenden Arbeit zur Verfügung gestellt hat.

*„Ernst zu nehmende Forschung erkennt man daran,
dass plötzlich zwei Probleme existieren, wo es vorher nur eines gegeben hat.“*

Thorstein B. Veblen

meiner Judith

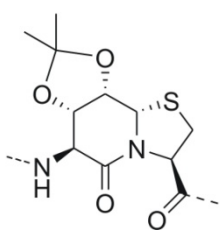
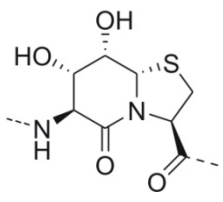
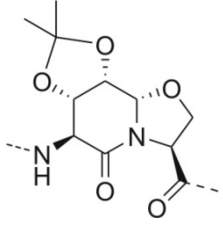
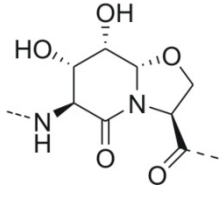
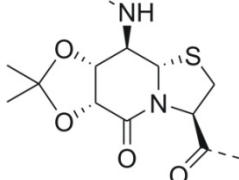
Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Struktur von Proteinen und Peptiden	1
1.1.1	Die α -Helix	2
1.1.2	Das β -Faltblatt	3
1.1.3	Schleifenstrukturen	4
1.2	Strukturaufklärung mittels ein- und zweidimensionaler NMR-Spektroskopie	5
1.2.1	COSY correlation spectroscopy	6
1.2.2	TOCSY total correlated spectroscopy	6
1.2.3	HMQC bzw. HSQC heteronuclear multiple quantum coherence bzw. heteronuclear single quantum coherence	6
1.2.4	HMBC heteronuclear multiple bond coherence	6
1.2.5	NOESY nuclear overhauser enhancement spectroscopy	7
1.2.6	Messung unter physiologischen Bedingungen – Möglichkeiten der Wasserunterdrückung	8
1.2.7	Konformationsbestimmung in Lösung	9
1.3	Peptidmimetika	11
2	Aufgabenstellung.....	16
3	Struktur und Synthese.....	17
3.1	Synthese bizyklischer Dipeptidbausteine.....	17
3.1.1	Darstellung des 6,5-bizyklischen Thiazolidinlactams (2)	17
3.1.2	Synthese des Dipeptidbausteins Fmoc-Pli ^P =Cat-OH (6)	19
3.1.3	Betrachtung der konformativen Stabilität verschiedener Thiazolidinlactame	20
3.2	Anwendung von Pli=Cat in der Peptidsynthese	22
3.2.1	Darstellung synthetischer Peptide	22
3.2.2	Synthese des zyklischen, C ₂ -symmetrischen Peptids (12).....	24
3.2.3	Konformationsanalyse der Zyklopeptide (12) und (13).....	27
3.2.4	Synthese und Konformationsanalyse des C ₁ -symmetrischen Zyklopeptids (17)	30
3.2.5	Darstellung und Konformationsanalyse eines C ₁ -symmetrischen zyklischen Hexapeptids mit nur einem Dipeptidbaustein (19).....	33
3.2.6	Synthese und Charakterisierung des offenkettigen Peptids (21).....	35
3.3	Bewertung von Pli=Cat seitens der Anforderungen an ein β -turn-Mimetikum.....	37
3.3.1	Darstellung und Konformationsanalyse der Btd-Zyklopeptide (22) und (23)	38
3.4	Synthese des Übergangszustands-Analogons (27).....	41
3.4.1	Versuch zur Darstellung eines [Pli ^{BP} =Cat-Gly] ₂ Zyklopeptids.....	44

3.5	Darstellung und Charakterisierung der Substanzklasse der 6,5-bizyklischen Oxazolidinlactame (33).....	46
3.5.1	Verwendung von Pli=Cat ⁰ in den zyklischen Hexapeptiden (45) und (46).....	49
3.5.2	Konformationsanalyse der Zyklopeptide (45) und (46).....	51
3.6	Darstellung und Charakterisierung eines Somatostatin-Analogons (49)	53
3.7	Das <i>Alzheimer</i> -Peptid als Templat für die Einführung eines β -turns	57
3.7.1	Synthese und NMR-Strukturaufklärung des Zyklopeptids (50).....	58
3.8	Click-Reaktionen am Azid des Dipeptidbausteins	63
3.9	Oligomere Peptidmimetika	64
3.9.1	Darstellung der Dipeptidmimetikums-Oligomere	64
4	T4 Bakteriophage, Fibrin und Foldon	71
4.1	Synthese artifizierender Foldonderivate.....	73
4.1.1	Vorüberlegungen.....	73
4.1.2	Erste Synthesen von Foldon-Mutanten.....	75
4.1.3	Charakterisierung der Verbindungen (60) und (61).....	76
4.1.4	Versuche zur Stabilisierung der Glu9-Gly10-Mutante.....	83
4.1.5	Überprüfung der Modifikationen seitens der Asp9-D-Ala10-Foldone	86
4.1.6	Modifikationen des PPII-helikalen Bereichs durch zusätzliche Dipeptidbausteine als Prolin-Analoga	89
4.1.7	Synthese und Charakterisierung N-substituierter Asp9-D-Ala10 Foldone	91
4.1.8	Substitutionen von Tyr2 gegen andere Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten	91
4.1.9	Einführung eines N-terminalen Azidoglycins zur Ligation.....	93
4.1.10	Modifikationen des β -turns im Foldon.....	94
4.1.11	Alaninscan der Salzbrücke zwischen Lys16 und Glu19.....	96
4.1.12	Untersuchung der Auswirkungen von D-Ala10 und Pli=Cat17,18 durch Einzelmutationen des nativen Foldons	98
4.2	Vergleich der vorliegenden Foldon-Trimere seitens ihrer Stabilität.....	100
4.2.1	NMR-Titration zur Stabilitätsbestimmung der Foldon-Mutanten (61) und (81).....	101
4.3	Überblick über die Modifikationen	103
4.4	Betrachtung der Kristallisationsneigung der Foldone: Stabilität versus Flexibilität.....	104
4.5	Diskussion der Proteinkristallstrukturen	105
4.5.1	Struktur des [Δ Gly ¹ , Nal ² , D-Ala ¹⁰ , Pli ¹⁷ =Cat ¹⁸]-Foldons.....	106
4.5.2	Struktur des [D-Ala ¹⁰ , D-Phe ¹⁷]-Foldons	113
5	Zusammenfassung und Ausblick	117
6	Experimenteller Teil	119

6.1	Allgemeine Anmerkungen	119
6.2	Allgemeine Protokolle für die Festphasensynthese	122
6.2.1	Beladen von 2-Cl-2-Tritylharz	122
6.2.2	Festphasenprotokoll I	123
6.2.3	Festphasenprotokoll II	123
6.3	Beschreibung der Experimente	124
7	Literaturverzeichnis	199

Abkürzungsverzeichnis

Pli ^P =Cat		<ul style="list-style-type: none"> • 6,5-bicyklisches Thiazolidinlactam • 7-OH und 8-OH als Acetal geschützt • 6 N-substituiert
Pli=Cat		<ul style="list-style-type: none"> • 6,5-bicyklisches Thiazolidinlactam • 7-OH und 8-OH frei • 6 N-substituiert
Pli ^P =Cat ^O		<ul style="list-style-type: none"> • 6,5-bicyklisches Oxazolidinlactam • 7-OH und 8-OH als Acetal geschützt • 6 N-substituiert
Pli=Cat ^O		<ul style="list-style-type: none"> • 6,5-bicyklisches Oxazolidinlactam • 7-OH und 8-OH als Acetal frei • 6 N-substituiert
Pli ^{8P} =Cat		<ul style="list-style-type: none"> • 6,5-bicyklisches Thiazolidinlactam • 6-OH und 7-OH als Acetal geschützt • 8 N-substituiert

Å	Ångström
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
aq.	wässrige/er
Boc	Tertiärbutyloxycarbonyl
Boc ₂ O	Tertiärbutyloxycarbonsäureanhydrid
br	Breit (NMR)
bs	breites Singulett (NMR)
Btd	β-turn Dipeptid
c	Konzentration
C	Celsius
CDCl ₃	Chloroform (deutert)

COSY	<i>Corelated Spectroscopy</i>
d	Dublett (NMR), Tage
δ	chemische Verschiebung
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
dd	Doppeldublett (NMR)
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMP	2,2-Dimethoxypropan, Dess-Martin-Periodinan
DMSO _{d6}	Dimethylsulfoxid (deutert)
DPPA	Phosphorsäurediphenylesterazid
EE	Essigsäureethylester
Et	Ethyl
eq	Äquivalent
ESI	Elektronen Spray Ionisation
<i>et al.</i>	und Andere (aus dem Lateinischen <i>et alii, et aliae</i>)
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyloxy
Fmoc-Cl	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-chlorid
Fmoc-OSu	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-succinimid
g	Gramm
h	Stunde(n)
HBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
HOBt	1-Hydroxy-benzotriazol
Hz	Hertz
HRMS	High Resolution Mass Spectroscopy
Isopr.	Isopropyliden
<i>J</i>	Spin-Spin-Kopplung
K	Kelvin
kat	Katalytisch
Kat	Katalysator
L	Liter
Lit.	Literatur
LM	Lösungsmittel

m	Multiplett (NMR), medium (IR)
MeOH	Methanol
min	Minute
MHz	Megahertz
mL	Milliliter
mmol	Millimol
μmol	Mikromol
mol	Mol
Ms	Methansulfonyl
MsCl	Methansulfonsäurechlorid
NEt ₃	Triethylamin
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
ppm	<i>parts per million</i> (NMR)
<i>p</i> TsOH	<i>p</i> -Toluolsulfonsäure
Pyr	Pyridin
quart.	Quartärer Kohlenstoff
R _f	Retentionsfaktor
ROE	<i>Rotating-Frame Nuclear Overhauser Effect</i>
ROESY	<i>Rotating-Frame Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
RT	Raumtemperatur
s	Singulett (NMR), stark (IR)
t	Triplett (NMR)
Tf	Trifluormethansulfonyl
Tf ₂ O	Trifluormethansulfonsäureanhydrid
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
THF	Tetrahydrofuran
TIPS	Triisopropylsilan
vgl.	vergleiche
w	<i>weak</i> , engl. schwach (IR)
WATERGATE	<i>Water Suppression by Gradient-tailored Excitation</i>

1 Einleitung

1.1 Struktur von Proteinen und Peptiden

Proteine sind biologische Makromoleküle, welche für die Ausführung vieler biochemischer Funktionen innerhalb einer Zelle verantwortlich sind, aber ebenso eine Vielzahl struktureller Aufgaben erfüllen. Sie katalysieren Reaktionen, transportieren und speichern andere Moleküle, z.B. Sauerstoff, sorgen für Stabilität, übermitteln Nervenimpulse oder kontrollieren das Wachstum. Die biologische Funktion eines bestimmten Proteins rührt von seiner einzigartigen, gefalteten Struktur her, welche wiederum durch die Aminosäuresequenz der Polypeptidkette bestimmt wird.^[1, 2]

Aufgrund der Kettenlänge wird zwischen Peptiden (griech. *peptos* „verdaut“) und Polypeptiden bzw. Proteinen (griech. *proteios* „der Erste“) unterschieden. Die formelle Grenze seitens der Kettenlänge zwischen Peptid und Protein liegt bei etwa 50, wenn gleich ältere Quellen 100 Aminosäureeinheiten für den Übergang vom Peptid zum Protein angeben.^[3]

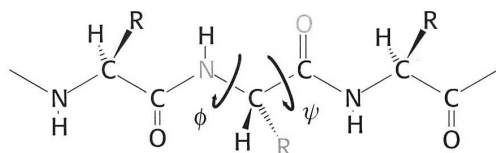


Abbildung 1 Rotation um die Bindung innerhalb einer Polypeptidkette. N-C α (Φ) und C α -C (Ψ).^[2]

Um zu erklären wie übergeordnete bzw. gefaltete Strukturen innerhalb eines Proteins entstehen ist es wichtig die Primärstruktur, also die Abfolge der Aminosäuren im Peptid, zu betrachten. Diese α -Peptidkette ist in ihrer Bewegungsfreiheit mehr oder weniger stark eingeschränkt. Der partielle Doppelbindungscharakter einer Peptidbindung bedingt die planare Anordnung der Substituenten in cis- oder trans-Konfiguration. Die trans-Konfiguration ist allerdings aufgrund geringerer sterischer Abstoßung der Substituenten am α -Kohlenstoff bevorzugt.

Im Gegensatz zur Amidbindung ist eine Rotation zwischen N-C α (Φ) und C α -C (Ψ) möglich, allerdings unterliegen auch diese Rotationen sterischen Restriktionen. Daher können die Torsionswinkel Φ und Ψ innerhalb eines

Peptids nur bestimmte Werte annehmen. Die Auftragung der erlaubten Kombinationen von Φ und Ψ eines Peptids oder Proteins in einer zweidimensionalen Grafik ergeben den *Ramachandran-Plot* (Abbildung 2).^[4]

Nur drei relativ kleine Bereiche des *Ramachandran-Plots* sind physikalisch für die meisten Aminosäuren

Um zu erklären wie übergeordnete bzw. gefaltete Strukturen innerhalb eines Proteins entstehen ist es wichtig die Primärstruktur, also die Abfolge der Aminosäuren im Peptid, zu betrachten. Diese

α -Peptidkette ist in ihrer Bewegungsfreiheit mehr oder weniger stark eingeschränkt. Der partielle Doppelbindungscharakter einer Peptidbindung bedingt die planare Anordnung der Substituenten in cis- oder trans-Konfiguration. Die trans-Konfiguration ist allerdings aufgrund geringerer sterischer Abstoßung der Substituenten am α -Kohlenstoff bevorzugt.

Im Gegensatz zur Amidbindung ist eine Rotation zwischen N-C α (Φ) und C α -C (Ψ) möglich, allerdings unterliegen auch diese Rotationen sterischen Restriktionen. Daher können die Torsionswinkel Φ und Ψ innerhalb eines

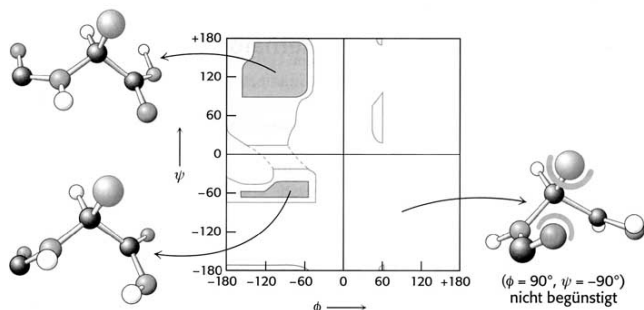


Abbildung 2 Darstellung eines *Ramachandran-Plots* und der grafischen Darstellung für den Ausschluss verschiedener (Φ , Ψ)-Kombinationen.^[2]

zugänglich. Die Werte für Φ und Ψ experimentell ermittelter peptidischer Strukturen zeigen diesbezüglich eine sehr hohe Übereinstimmung. Allerdings gibt es zwei Ausnahmen, zum Einen ist durch die zyklische Seitenkette des Prolins der Φ -Wert auf etwa -80° beschränkt, zum Anderen ist Glycin durch die fehlende Seitenkette sterisch sehr viel weniger gehindert. Daher überziehen erlaubte Kombinationen von Φ und Ψ für Glycin den *Ramachandran-Plot* fast vollständig. Insgesamt wird durch die Starrheit der Peptidbindung sowie durch die Einschränkung von Φ und Ψ die Anzahl der möglichen Konformationen der α -Peptidkette so stark herabgesetzt, dass eine Proteinfaltung möglich wird.^[2]

Nachfolgend sollen die drei prominentesten Sekundärstrukturmotive in Peptiden vorgestellt und unterschieden werden, die α -Helix, das β -Faltblatt und β - bzw. γ -turns.

1.1.1 Die α -Helix

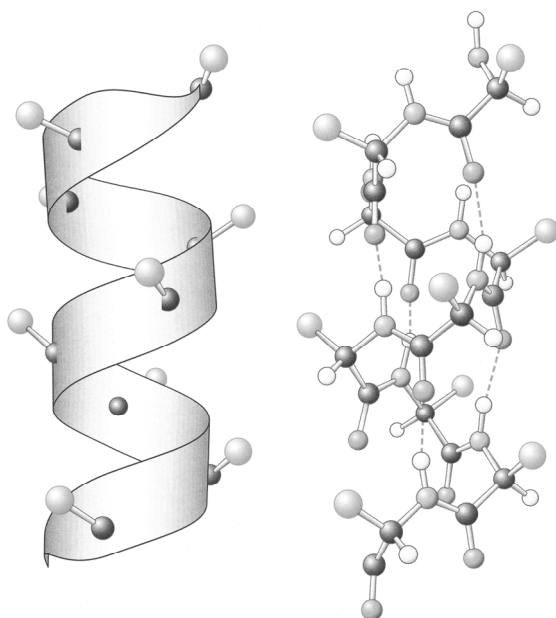


Abbildung 3 Darstellung einer α -Helix.^[2]

Die α -Helix ist das am häufigsten vorkommende Strukturelement in Proteinen. Eine Charakterisierung kann durch die entsprechende Region im *Ramachandran-Plot* ($\Phi = -57^\circ$ und $\Psi = -47^\circ$) oder durch die Anzahl an Aminosäuren einer Helixwindung mit definierter Ganghöhe stattfinden. Eine idealisierte α - oder auch 3.6_{13} -Helix bildet eine Windung aus 3.6 Aminosäuren und besitzt eine Ganghöhe von 5.4 \AA . Die meisten α -Helices in Proteinen zeigen eine leichte Verzerrung hinsichtlich der Idealisierung; die Anzahl der Aminosäuren pro Windung bewegt sich allgemein zwischen 3.5 und 3.7. Theoretisch

kann eine α -Helix sowohl rechts- als auch linksgängig sein, allerdings zeigen α -Helices, welche in Proteinen vorkommen, fast ausschließlich einen rechtsgängigen Drehsinn (Abbildung 3). Charakteristisch für eine Helix ist das Vorhandensein eines Wasserstoffbrückenmusters zwischen den einzelnen Windungen der Helix. Im Beispiel der α -Helix wird zwischen jeder NH-Gruppe und dem Carbonyl der $i+4$ ten Aminosäure eine Wasserstoffbrücke ausgebildet, so dass ein 13gliedriger Ring entsteht.^[2, 3] Dabei sind alle Carbonyle des Peptidrückgrats so angeordnet, dass die Sauerstoffatome in Richtung des C-Terminus ausgerichtet sind. Dieses regelmäßige Wasserstoffbrückenmuster führt in seiner Summe zu einer erheblichen Stabilisierung der α -Helix als Sekundärstruktur sowie zu einem Dipolmoment entlang der helikalen Achse.^[5] Als weitere

Helix kann beispielhaft die 3_{10} -Helix genannt werden. Hier wird die Wasserstoffbrücke nicht wie bei der 3.6_{13} -Helix zwischen der i und $i+4$ ten Aminosäure, sondern zwischen der i und $i+3$ ten ausgebildet. Dadurch entsteht ein zehngliedriger Ring, welcher um drei Atome kleiner als die α -Helix ist. Aufgrund der sterischen Behinderung und ihrer ungünstigeren Geometrie der Wasserstoffbrücken ist die 3_{10} -Helix daher weniger stabil als die α -Helix.^[5]

1.1.2 Das β -Faltblatt

Das β -Faltblatt ist wie die α -Helix ein periodisches Strukturmotiv, jedoch ist die Polypeptidkette im β -Faltblatt fast vollständig gestreckt (β -Strang). Die Peptidketten bilden Wasserstoffbrücken untereinander aus und treten so

in Wechselwirkung. Der mittlere Abstand zweier Polypeptidketten in einem β -Faltblatt beträgt 7 Å.

Bei gleicher Ausrichtung von N- und C-Terminus der β -Stränge wird das Faltblatt als parallel, bei gegenläufiger Ausrichtung als antiparallel bezeichnet (Abbildung 4).

Die Regionen im *Ramachandran-Plot* liegen bei $\Phi = -119^\circ$ / $\Psi = 113^\circ$ für das parallele und bei $\Phi = -139^\circ$ / $\Psi = 135^\circ$ für das antiparallele β -Faltblatt.^[2, 3] Parallele Faltblätter

weisen eine geringere Stabilität als antiparallele auf, dies kann

damit begründet werden, dass parallele β -Faltblätter ein leicht verzerrtes Wasserstoffbrückenmuster im Vergleich zur optimalen Anordnung zeigen. In Proteinen zeigen sich nur selten isolierte β -Stränge, da diese Struktur alleine nicht sehr viel stabiler ist als andere Konformationen. Auch ist die Bezeichnung Sekundärstruktur für ein β -Faltblatt nicht ganz richtig; oftmals liegen die β -Stränge in Proteinen weit auseinander und können sich erst nach Ausbildung der Tertiärstruktur zu einem Faltblatt zusammenlagern.^[5]

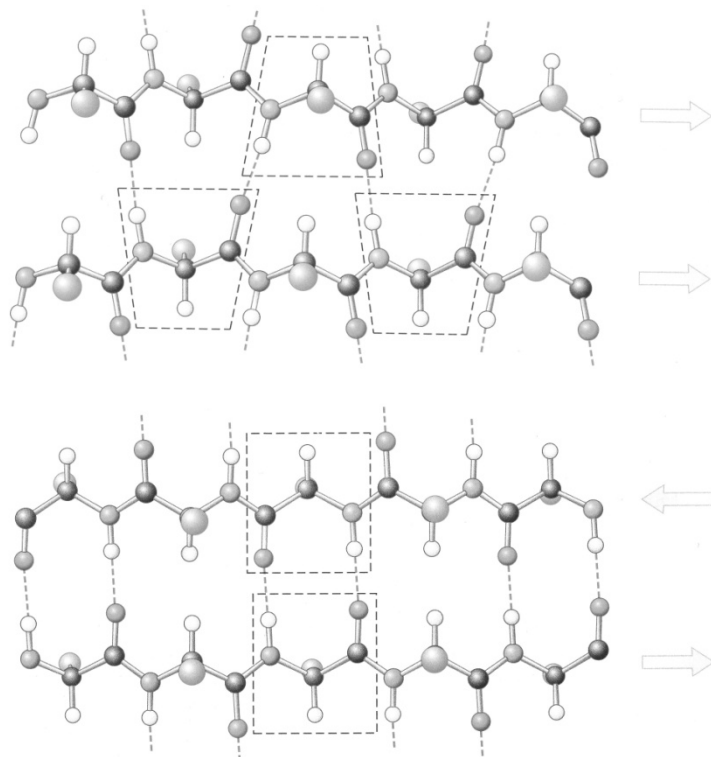


Abbildung 4 Darstellung eines parallelen (oben) sowie eines antiparallelen (unten) β -Faltblatts.^[2]

1.1.3 Schleifenstrukturen

In einer α -Helix oder einem β -Strang weisen die aufeinanderfolgenden Aminosäuren eine ähnliche Konformation auf, welche sich über das Motiv der Sekundärstruktur fortsetzt. Peptide und Proteine weisen aber auch Abschnitte mit einer dreidimensionalen Struktur auf, welche sich nicht periodisch fortsetzt. Viele dieser Abschnitte können als *Loops* oder *Turns* identifiziert werden. *Loops* enthalten häufig hydrophile Reste und stehen mit der Umgebung des Proteins, beispielsweise dem Lösungsmittel in Kontakt. Ist die Anzahl, der an einer Schleifenstruktur beteiligten Aminosäuren, beschränkt und wird dadurch eine Umkehr der Polypeptidkette verursacht, werden diese als *Turns* bezeichnet.^[5]

Der β -turn als Strukturmotiv kommt fast ausschließlich an der Oberfläche von Proteinen vor, hier können posttranslationale Modifikationen vorgenommen werden oder der Turn kann als Erkennungsstelle für Antikörper oder Rezeptoren dienen.^[7-10]

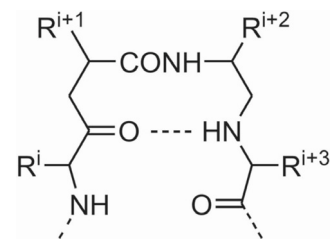


Abbildung 5 Schematische Darstellung eines β -turns, angedeutet ist die Wasserstoffbrücke, welche einen zehngliedrigen Ring bildet.^[6]

Aufgebaut ist der β -turn aus vier Aminosäuren ($i \rightarrow i+3$). Im Turn kann eine Wasserstoffbrücke zwischen dem amidischen Proton der $i+3$ -ten und dem Carbonyl der i -ten Aminosäure zur Stabilisierung der Struktur ausgebildet sein, jedoch ist das Vorhandensein nicht entscheidend. Der Abstand zwischen dem ersten und letzten α -Kohlenstoff darf weiterhin nicht mehr als 7.0 Å betragen.^[6, 7, 11, 12] In vielen Proteinen stellen die β -turns einen merklichen Anteil der Proteinstruktur, hierbei ist es auch möglich, dass die Werte für Φ und Ψ außerhalb der regulären Bereiche des *Ramachandran-Plots* liegen. Insbesondere tritt dies bei β II-Turns auf, welche ein Glycin enthalten. In Abhängigkeit der Torsionswinkel können β -turns in verschiedenen Typen unterteilt werden (Tabelle 1).^[13] Während

Tabelle 1 Unterteilung von β -turns entsprechend ihrer Dieder-Winkel nach Thornton et al.

Turn Typ	Dieder-Winkel			
	ϕ_{i+1}	ψ_{i+1}	ϕ_{i+2}	ψ_{i+2}
I	-64°	-27°	-90°	-7°
II	-60°	131°	84°	1°
VIII	-72°	-33°	-123°	121°
I'	55°	38°	78°	6°
II'	60°	-126°	-91°	1°
VIa1	-64°	142°	-93°	5°
VIa2	-132°	139°	-80°	-10°
VIb	-135°	131°	-76°	157°
IV	-61°	10°	-53°	17°

der β -turn durch die mögliche Wasserstoffbrücke einen zehngliedrigen Ring bildet, bildet der sogenannte γ -turn einen siebengliedrigen Ring zwischen dem amidischen Proton der $i+2$ -ten und dem Carbonyl der i -ten Aminosäure aus. Auch die Fähigkeit des β -turns durch eine 180° Umkehr der Polypeptidkette ein β -Faltblatt zu induzieren ist beim γ -turn nicht gegeben.^[14] Neben den bisher besprochenen Ordnungsmerkmalen von Proteinen existieren

noch zwei weitere, welche vor allem auf hydrophoben Wechselwirkungen basieren. Die Tertiärstruktur bezeichnet die Struktur eines Proteins, welche aus der Faltung einer Polypeptidkette hervorgeht; hierbei handelt es sich um eine meist dicht gepackte dreidimensionale Struktur. In einer Tertiärstruktur können Aminosäuren, welche in der Primärstruktur weit auseinander liegen, durch Faltung der Polypeptidkette in direkter räumlicher Nähe angeordnet werden. Während die Stabilisierung von Sekundärstrukturen vor allem auf der Ausbildung von Wasserstoffbrücken beruht, resultiert die Stabilität der Tertiärstruktur vor allem aus nichtkovalenten, meist hydrophoben Wechselwirkungen. Weiterhin kann eine Stabilisierung der Tertiärstruktur beispielsweise durch die Ausbildung von Disulfidbrücken stabilisiert werden. Eine zusätzliche, der Tertiärstruktur übergeordnete Organisationsebene von Proteinen wird als Quartärstruktur bezeichnet. Diese beschreibt die Anordnung mehrerer nicht kovalent verknüpfter Polypeptid-Ketten. Das einfachste Modell einer Quartärstruktur wäre ein Dimer, aufgebaut aus zwei identischen Untereinheiten. Die Stabilisierung der Quartärstruktur resultiert ähnlich wie die Tertiärstruktur vor allem aus hydrophoben Wechselwirkungen; hinzu kommen aber elektrostatische Wechselwirkungen, welche z.B. aus unterschiedlich geladenen Seitenketten resultieren. Die Quartärstruktur kann aus identischen genauso wie aus unterschiedlichen Polypeptid-Ketten aufgebaut sein, in jedem Fall stehen die einzelnen Bestandteile der Quartärstruktur in einem definierten stöchiometrischen Verhältnis zueinander.^[2, 5]

1.2 Strukturaufklärung mittels ein- und zweidimensionaler NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektroskopie ist die derzeit einzige experimentelle Methode um detaillierte Informationen über die Struktur von Proteinen und Peptiden in Lösung zu erhalten. Im Gegensatz zur Röntgenstrukturanalyse erlaubt die NMR-Spektroskopie die Untersuchung einer Verbindung im gelösten Zustand unter Variation von Temperatur, Konzentration und Lösungsmittel.^[15] Dynamische Prozesse, welche langsam im Vergleich zur NMR-Zeitskala ablaufen, können so aufgelöst werden. Um die Konformation einer beliebigen Verbindung in Lösung zu bestimmen muss zuvor jedoch eine Zuordnung der beobachteten Signale stattfinden. Im einfachsten Fall ist eine Zuordnung der Signale aufgrund ihrer Phänomenologie und damit verbunden ihrer Kopplungskonstanten möglich. Da diese sehr einfache Art der Zuordnung allerdings bei komplexeren Verbindungen nicht mehr möglich ist, sollen hier nachfolgend die standardmäßig verwandten 2D-NMR-spektroskopischen Methoden zur vollständigen ^1H - und ^{13}C -NMR Zuordnung vorgestellt werden.

1.2.1 COSY correlation spectroscopy

Beim COSY-Spektrum handelt es sich um eine zweidimensionale Methode welche die skalaren 2J - und 3J -Kopplungen gleicher Kerne darstellt. Theoretisch sollte ein COSY-Spektrum symmetrisch im Bezug auf die Diagonale sein, da beide Frequenzdomänen die gleichen Informationen der ^1H -NMR-Verschiebung enthalten.^[16]

1.2.2 TOCSY total correlated spectroscopy

Ähnlich wie beim COSY-Spektrum werden auch beim TOCSY-Spektrum gleiche Kerne über ihre skalaren Kopplungen korreliert; allerdings werden beim TOCSY-Spektrum in Abhängigkeit der spin-lock Zeit und der Größe der ^1H , ^1H -Kopplungen alle Kerne eines zusammengehörigen Spinsystems angeregt. Das TOCSY-Spektrum ist besonders hilfreich wenn ein Molekül mehrere isolierte Spinsysteme enthält, wie im Beispiel von Peptiden oder Proteinen. Hier werden die einzelnen Spinsysteme der Aminosäuren durch die Amidbindung unterbrochen, so dass eine eindeutige Zuordnung möglich wird. Aufgrund der höheren Sensitivität des TOCSY-Spektrum im Vergleich zum COSY-Spektrum können Kopplungskonstanten durch Extraktion aus den Reihen und Spalten eines TOCSY-Spektrums ausgelesen werden.^[16]

1.2.3 HMQC bzw. HSQC heteronuclear multiple quantum coherence bzw. heteronuclear single quantum coherence

Das HMQC-Spektrum bzw. das HSQC-Spektrum stellen Methoden zur Korrelation der $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ mittels einer skalaren 1J -Kopplung dar. Im HMQC/HSQC-Spektrum wird auf der x-Achse die ^1H -, auf der y-Achse die ^{13}C -Verschiebung aufgetragen. Die entsprechenden Kreuzsignale geben die direkte Konnektivität eines Protons zum dazugehörigen Kohlenstoff an. Das HMQC/HSQC-Spektrum setzt sich also grundsätzlich aus einem ^1H -NMR- und einem breitbandentkoppelten ^{13}C -NMR-Spektrum zusammen.^[16]

1.2.4 HMBC heteronuclear multiple bond coherence

Während HMQC-Spektrum und HSQC-Spektrum auf skalare 1J -Kopplungen begrenzt sind werden im HMBC-Spektrum 2J und 3J -Kopplungen unterschiedlicher Kerne, meistens ^1H , ^{13}C dargestellt. Im Gegensatz zum HMQC/HSQC-Experiment wird das HMBC-Experiment generell ohne ^{13}C -Entkopplung durchgeführt, so dass eine Unterscheidung zwischen 1J - und *long range*-Kopplungen möglich wird. 1J -Kopplungen erscheinen im HMBC-Spektrum ausschließlich als Satelliten des im HMQC/HSQC-Spektrum beobachteten Kreuzsignals. Das HMBC ermöglicht die Zuordnung verschiedener Spinsysteme, welche durch Heteroatome oder quartäre Kohlenstoffatome getrennt sind. Beispielsweise kann so in Peptiden die Sequenz der Aminosäuren über die amidische Bindung hinweg bestimmt werden.^[17, 18]

1.2.5 NOESY nuclear overhauser enhancement spectroscopy ROESY rotating frame NOE-spectroscopy

Anders als bei den zuvor vorgestellten Methoden werden bei NOESY/ROESY-Spektrum keine

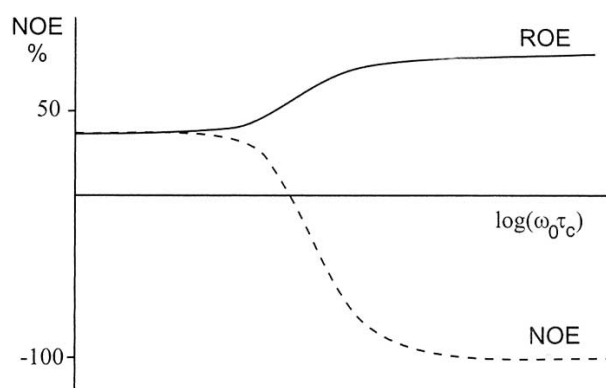


Abbildung 6 Schematische Darstellung der Signalintensität eines isolierten zwei-spin Systems in Abhängigkeit der molekularen *tumbling*-Rate für NOE und ROE.^[19]

skalaren sondern dipolare Kopplungen gemessen. Diese dipolaren Kopplungen stellen einen direkten Transfer der Magnetisierung unabhängig von der Konnektivität der betreffenden Atome dar. Dabei ist der Abstand der beiden Protonen (d) entscheidend für die Signalintensität (I): $I \sim d^{-6}$, diese ist indirekt proportional zur sechsten Potenz des Abstandes. Daher ist für die Detektierbarkeit eines NOE-Signals

ein Abstand von $< 4\text{-}5 \text{ \AA}$ notwendig. Ist der Abstand zweier Protonen bekannt, so kann dieser als Eichsignal verwendet werden; über die Intensitäten der Kreuzsignale des Eichsignals und des unbekannten Signals kann so der gesuchte Abstand bestimmt werden.

Der Nachteil des NOESY-Spektrum liegt in der Abhängigkeit von der molekularen Beweglichkeit, daher findet ein Vorzeichenwechsel der Signalintensität in Abhängigkeit von der Molekülgröße statt. Bei einem Molekulargewicht von etwa 500 g/mol kann der sogenannten „Nulldurchgang“ beobachtet werden. In diesem Bereich entspricht die molekulare *tumbling*-Rate der Frequenz des Spektrometers und die dipolaren Kopplungen von Molekülen dieser Größenordnung sind äußerst klein bzw. nicht detektierbar. Der Nulldurchgang hängt neben der Spektrometerfrequenz und der Größe und Form des zu beobachtenden Moleküls auch von den Eigenschaften des Lösungsmittels (Viskosität, Temperatur und pH-Wert) ab.^[19]

Ein Messverfahren, welches das Problem des Nulldurchgangs beim NOESY-Spektrum umgeht, ist beispielsweise das ROESY-Spektrum (Abbildung 6). Besonders auffällig ist hierbei das umgekehrte Vorzeichen der Kreuzsignale. Sind beim NOESY-Spektrum alle Signale, unabhängig von ihrer Entstehung durch dipolare Kopplung oder chemischen beziehungsweise konformationellen Austausch entstanden, positiv, so besitzen die Kreuzsignale beim ROESY ein

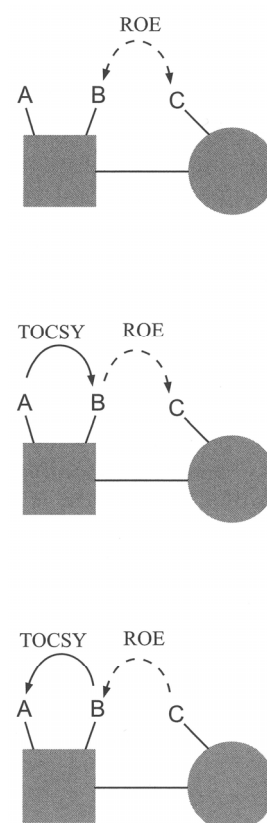


Abbildung 7 oben: richtiger B-C ROE, mittig: falscher A-C ROE, unten: falscher C-A ROE.^[19]

negatives Vorzeichen. Während beim NOESY-Spektrum eine Abfolge von 90° Puls – Entwicklungszeit – 90° Puls – Mischzeit – 90° Puls der Aufnahmen des FID vorausgeht, ist die Abfolge beim ROESY 90° Puls – Entwicklungszeit – spin-lock-Periode. Aufgrund der gleichen spin-lock-Periode von ROESY- und TOCSY-Spektrum kann es allerdings bei der Messung von ROE-Spektren zu TOCSY Artefakten im Spektrum kommen (Abbildung 7). Weiterhin können COSY-ähnliche Kreuzsignalen zwischen skalar gekoppelten Kernen beobachtet werden.^[19, 20]

1.2.6 Messung unter physiologischen Bedingungen – Möglichkeiten der Wasserunterdrückung

Da die Art des Lösungsmittels einen deutlichen Einfluss auf die Konformation von Biomolekülen besitzt, ist es notwendig, die Messungen unter physiologischen Bedingungen durchzuführen. Aufgrund der Verknüpfung von Funktion und Struktur bei Peptiden bzw. Proteinen sollte weiterhin immer versucht werden, die Struktur in vivo zu bestimmen. Dieses setzt die Messung in Wasser bzw. gepufferten wässrigen Lösungen voraus; eine Messung in D_2O ist hierbei nicht von Vorteil, da ansonsten die austauschenden Protonen (NH_2 -, OH -) nicht beobachtet werden könnten. Dementsprechend ist das Resonanzsignal des Wassers in einem standardmäßig aufgenommenen 1H -NMR-Spektrum sehr stark, was die Detektion der eigentlichen Signale unmöglich macht.

Daher setzen Messungen unter physiologischen Bedingungen die Unterdrückung des Wassersignals voraus. Eine Möglichkeit die Wasserunterdrückung zu erreichen besteht in der Vorsättigung des Wasser-Resonanzsignals. Dazu wird vor dem eigentlichen Anregungspuls eine schwache, auf die Frequenz des Wassers eingestellte, Radiofrequenz eingestrahlt. Diese bewirkt eine Vorsättigung der Wassermoleküle, so dass diese zum Zeitpunkt des Anregungspulses nicht wieder relaxiert sind. Dementsprechend erscheint das Wassersignal im Spektrum stark verringert, allerdings werden dadurch auch alle anderen Signale, die sich in der Nähe des Wasser-Resonanzsignals befinden ausgeblendet. Ebenso werden alle austauschenden Protonen angeregt und können dementsprechend auch nicht bzw. nur sehr schwach detektiert werden.^[21]

Eine andere Methode zur Unterdrückung des Wassersignals besteht im Einsatz gepulster Feldgradienten. Hierbei wird eine gepulste Gradientensequenz in Richtung der z-Achse eingestrahlt, welche eine Phasenverschiebung hervorruft. Durch nochmaliges Einstrahlen der gleichen Frequenz kann anschließend eine Phasengleichheit wiederhergestellt werden.^[22] Diese Technik kommt in der WATERGATE-Messung (*water suppression by gradient-tailored excitation*) zum Einsatz. Hierbei wird ein Feldgradient G1 eingestrahlt (Abbildung 8, oben), dadurch werden alle Spins phasenverschoben. Anschließend folgt eine Pulssequenz der folgenden Pulse: 3α - 9α - 19α - 19α - 9α - 3α (mit $26\alpha = 180^\circ$), zuletzt wird erneut der Feldgradient G1 eingestrahlt.

Insgesamt resultiert aus dieser Pulssequenz eine Anregung aller Protonen, außer denen, die mit dem *Offset* korrelieren (Abbildung 8, unten). Daher muss zur Unterdrückung des Wassersignals der *Offset* dem Resonanzsignal des Wassers entsprechen.^[23, 24] Problematisch seitens des *WATERGATE*-Experiments ist das Auftreten von Phasenfehlern sowie eine Verzerrung der Basislinie; das *DPFGSE*-Experiment stellt diesbezüglich eine Weiterentwicklung dar. Hierbei ist es möglich, mittels einer *WATERGATE*-

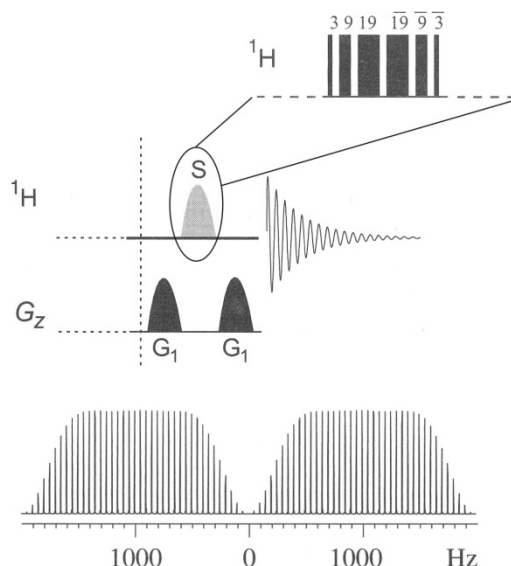


Abbildung 8 Oben: Sequenz der *WATERGATE*, unten: Anregungsprofil der *WATERGATE* nach [19].

ähnlichen Sequenz, welche aus zwei hintereinander durchgeführten *WATERGATE*-Pulssequenzen besteht, die Probleme des ursprünglichen *WATERGATE*-Experiments zu umgehen.^[25-27]

1.2.7 Konformationsbestimmung in Lösung

Die Bestimmung einer übergeordneten Struktur setzt die vollständige Zuordnung aller NMR-Signale voraus. Im Anschluss daran kann mit der Konformationsanalyse der Struktur in Lösung begonnen werden. Hierbei ist wichtig zu beachten, dass nur unter der Voraussetzung des Vorliegens einer einheitlichen Struktur eine genaue Bestimmung derselben möglich ist. Handelt es sich um eine Verbindung welche eine dynamische Struktur zeigt, also mehrere Konformationen einnehmen kann, so wird nur eine gemittelte Struktur beobachtet. Die Konformationsanalyse ist hier nicht möglich, da kein linearer Zusammenhang zwischen den NMR-Parametern und den geometrischen Parametern der Molekülstruktur existiert.^[28]

Es zeigt sich bei der spektroskopischen Untersuchung von Peptiden in Lösung, dass oftmals ein sich schnell einstellendes Gleichgewicht zwischen vielen Konformationen vorliegt. So bleibt auch eine beobachtete konformative Starrheit auf Teilbereiche des Peptids beschränkt. Die Seitenketten beispielsweise behalten weiterhin ihren relativ großen Bewegungsfreiraum bei. Eine Möglichkeit zur Beschränkung der Freiheitsgrade eines Peptids besteht in der Zyklisierung, wodurch die Beweglichkeit des Peptidgerüsts und somit die Freiheitsgrade stark herabgesetzt werden.

Hinweise auf konformative Homogenität können Unterschiede der chemischen Verschiebungen, der Kopplungskonstanten und der Temperaturabhängigkeiten der verschiedenen Aminosäureeinheiten sein. Je geringer diese Unterschiede sind, desto größer ist die

Wahrscheinlichkeit, dass ein sich schnell einstellendes Gleichgewicht verschiedener Konformationen für die Mittelung der spektroskopischen Daten verantwortlich ist.^[15]

Die wichtigsten Kriterien, welche Indizien für konformative Homogenität darstellen sind: (nach Kessler)^[15]

- *starke Differenzierung der Temperaturgradienten der NH-Signale*
- *starke Differenzierung in den chemischen Verschiebungen gleichartiger Aminosäuren in der Sequenz*
- *große Aufspaltungen der chemischen Verschiebungen von diastereotopen Protonen*
- *starke Differenzierung von vicinalen Kopplungen zu diastereotopen Protonen (NH zu den beiden α -Protonen in Glycin, C_{α} -H zu zwei diastereotopen β -Protonen)*
- *große Unterschiede in den NH- C_{α} H-Kopplungskonstanten (ein Wert um 7.5 Hz kann auch als Mittelwert bei freier Beweglichkeit interpretiert werden)*

Das Fehlen der folgenden Indizien kann ebenfalls für konformative Homogenität sprechen:

(nach Kessler)^[15]

- *Nichtlinearität der Temperaturgradienten der NH-Signale*
- *Änderung von Kopplungskonstanten bei Wechsel des Lösungsmittels*

Einen deutlichen Hinweis auf eine vorliegende einheitliche Struktur können die Orientierungen der Amidbindungen in Peptiden geben. Diese können als Wasserstoffbrückendonator inter- oder intramolekular bzw. mit dem Lösungsmittel wechselwirken. Da aufgrund entropischer Effekte die Stabilität von intramolekularen Wasserstoffbrücken sehr viel höher als diejenige von intermolekularen oder zum Lösungsmittel hin aufgebauten ist, können diese unterschiedlichen Wechselwirkungen leicht unterschieden werden. Unter Betrachtung der Temperaturabhängigkeit ($\Delta\delta/T$) der amidischen Protonen im DMSO, zeigt sich, dass bei einem Wert größer 4 ppb/K eine Orientierung zum Lösungsmittel vorliegt. Hingegen deutet ein Temperaturgradient von < 2 ppb/K auf eine starke Abschirmung vom Lösungsmittel hin; diese kann durch eine Intramolekulare Wasserstoffbrücke oder eine sterische Abschirmung bedingt sein.^[15, 29]

Eine besondere Bedeutung für die Konformationsanalyse kommt den vicinalen 3J -Kopplungskonstanten zu, da diese über die *Karplus*-Gleichung mit ihren Dieder-Winkeln in Bezug gesetzt werden können. Die *Karplus*-Gleichung in ihrer ursprünglichen Form lautet: $^3J(\Phi) = A + B \cos \Phi + C \cos 2\Phi$.^[30, 31] Da die Kopplungskonstanten allerdings nicht nur von den Dieder-Winkeln, sondern auch stark vom Substitutionstyp und der Elektronegativität der Substituenten abhängen, sind die Konstanten A, B und C stets neu zu ermitteln. Durch umfangreiche Experimente konnten jedoch für verschiedene Substitutionsmuster die

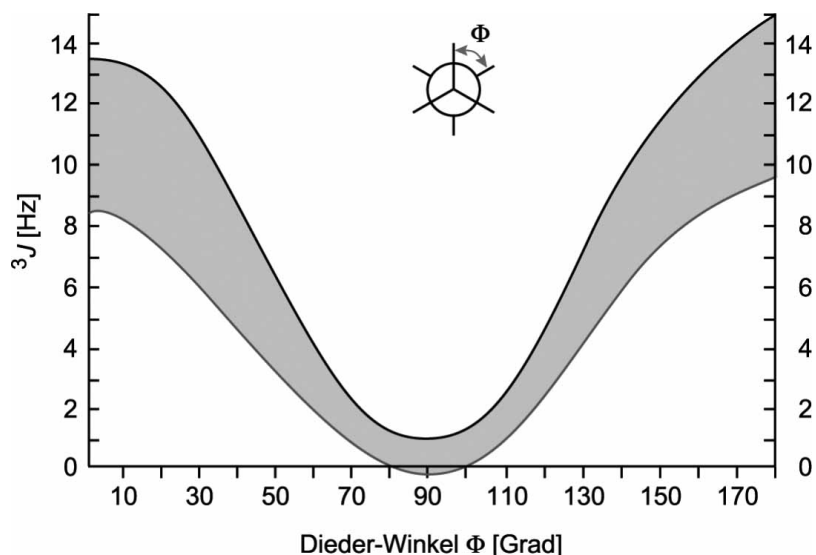


Abbildung 9 Verallgemeinerte *Karplus*-Kurve für gesättigte Kohlenwasserstoffe. Darstellung des Bereichs der 3J -Kopplungskonstante in Abhängigkeit vom Dieder-Winkel Φ . Zu erkennen ist, dass die Bestimmung des Dieder-Winkels nur für bestimmte Bereiche der der Kopplungskonstanten sinnvoll ist.^[36, 37]

Koeffizienten empirisch ermittelt werden.^[32-35] Problematisch ist allerdings die Mehrdeutigkeit der Karplus-Kurve (Abbildung 9) und die damit verbunden Fehlerbreite des zu bestimmenden Dieder-Winkels; eher kann hier von einer Eingrenzung des Konformationsfreiheitsraums gesprochen werden.^[15]

1.3 Peptidmimetika

Peptidmimetika sind Verbindungen, die Bestandteile eines natürlichen Peptids oder Proteins in der dreidimensionalen Struktur nachahmen, die Fähigkeit der Wechselwirkung mit der biologischen Zielverbindung beibehalten sowie die gleiche biologische Antwort hervorrufen.^[38]

Aufgrund von Problemen, wie beispielsweise der schlechten Rezeptorsubtyp Selektivität, der Proteolyseempfindlichkeit oder der begrenzten Möglichkeit zur Aufnahme, die therapeutisch relevante Peptide meistens begleiten, ist die Synthese selektiver Peptidmimetika von großem Interesse.^[39]

Systematische Substitution des Peptidrückgrats bzw. die Verwendung konformativ eingeschränkter Elemente bieten Ansatzmöglichkeiten um diese Probleme zu lösen.^[40, 41] Der β -turn als isoliertes Strukturmotiv, welches als Erkennungsstelle für Antikörper oder Rezeptoren dienen kann, ist seitens der Peptidmimetika von besonderem Interesse.^[7-10, 42] Grundsätzlich können β -turn-Mimetika in zwei Klassen unterteilt werden, interne sowie externe Mimetika.^[43]

Interne Mimetika sind so aufgebaut, dass sie den zehngliedrigen Ring eines β -turns nachahmen (Abbildung 10); der Schwerpunkt dieser Mimetika liegt auf der Ausrichtung der Seitenketten.

Beispielhaft sollen hier die ersten Arbeiten von *Olsen et al.* und *Kahn et al.* aufgeführt werden.^[44, 45]

Externe Mimetika hingegen sind oftmals so aufgebaut, dass diese die i+1 und i+2 Positionen eines β -turns besetzen, wobei der Fokus nicht auf der Ausrichtung der Seitenketten sondern der Konformation des

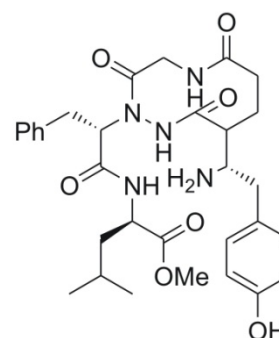
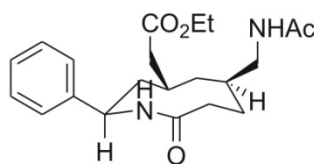
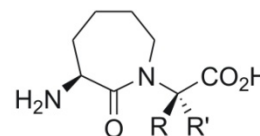
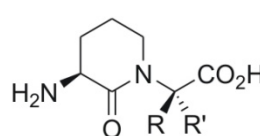
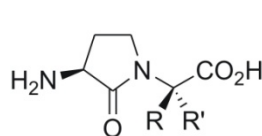


Abbildung 10 Zehngliedrige Ringe zum Nachahmen eines β -turns. Links *Olsen et al.*, rechts *Kahn et al.*

Peptidrückgrats liegt. Durch die Einschränkung der Flexibilität des Dipeptidbausteins selbst, oftmals durch zyklische Seitenkettenfunktionalitäten, soll die gewünschte Ausrichtung des Peptids erzielt werden.^[46] Anfang der 80er Jahre publizierten *Freidinger et al.* erstmals eine

Substanzklasse von monozyklischen Dipeptidisosteren,



welche in der nachfolgenden Zeit als **Abbildung 11** Beispiele für allgemeine Struktur der *Freidinger*-Lactame, ausgehend von penta-, hexa-, und heptazyklischen Ringen

Freidinger-Lactame bekannt wurden (Abbildung 11).^[47, 48] Bereits kurze Zeit später folgte die Veröffentlichung des β -turn-Dipeptids, dem ersten bizyklischen Dipeptidmimetikum, kurz Btd, von *Nagai und Sato*.^[49] Von *Robinson et al.* wurde ein bizyklisches Dipeptid, welches aus zwei über einen Kohlenstoff verknüpften Fünfringen bestand, Ende der 80er Jahre publiziert. Diese als *Spiro-Lactam* bezeichnete Substanzklasse wurde von *Johnson et al.* aufgegriffen und in leicht veränderter Form (Abbildung 12) 1993 erneut veröffentlicht.^[50, 51]

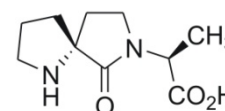
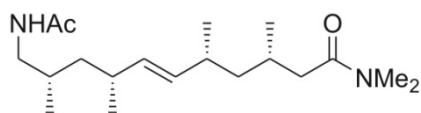


Abbildung 12 Allgemeine Struktur eines Spiro-Lactams, problematisch ist das Fehlen der funktionellen Seitenketten, nur der N- und C-Terminus sind funktionalisiert.

Die Darstellung eines flexiblen β II-hairpin Analogons gelang *R.W. Hoffmann et al.* 1997. Zur Stabilisierung der Konformation wurde hierbei die intramolekulare 1,3-Allylspannung der Verbindung gezielt eingesetzt (Abbildung 13).^[52] Für einen



Überblick der Entwicklung von 5,5-, 6,5- und 7,5-bizyklischen Dipeptidmimetika der letzten Jahre sei auf einen Übersichtsartikel von *Lubell* verwiesen.^[53]

Abbildung 13 Turn Mimetikum von *R.W. Hoffmann et al.*

Die Arbeitsgruppe Geyer befasst sich seit 10 Jahren sehr erfolgreich mit der Darstellung polyhydroxylierter Dipeptidmimetika sowie deren Folgeprodukte. Hierbei wird neben der Rigidität von bityklischen Ringsystemen zusätzlich die konformative Einschränkung von Zuckerderivaten genutzt.

Die erste Darstellung eines bityklischen Dipeptidmimetikums gelang ausgehend von 5-Azido-5-Deoxy-D-Glukurono-3,6-lacton durch Kondensation mit L-Cysteinmethylester in Wasser/Pyridin (Abbildung 14). Die anschließende Reduktion mit Trimethylsilyliodid und Carbamat-schätzung mit Boc₂O lieferten den

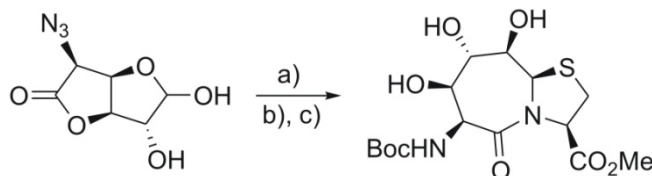


Abbildung 14 Synthese des 7,5-bityklischen Dipeptidmimetikums. a) L-Cys-OMe, H₂O/Pyridin 25:1, b) TMSI, NaI, c) Boc₂O, K₂CO₃, insg. 30% Ausbeute.

vollständig geschützten Dipeptidbaustein mit einer Ausbeute von 30%.^[54] Der Zugang zur in Abbildung 14 gezeigten 7,5-bityklischen Verbindung konnte weiter optimiert werden, so dass die Darstellung ausgehend von Glukuronsäure möglich war. Entsprechend der vorherigen Synthese

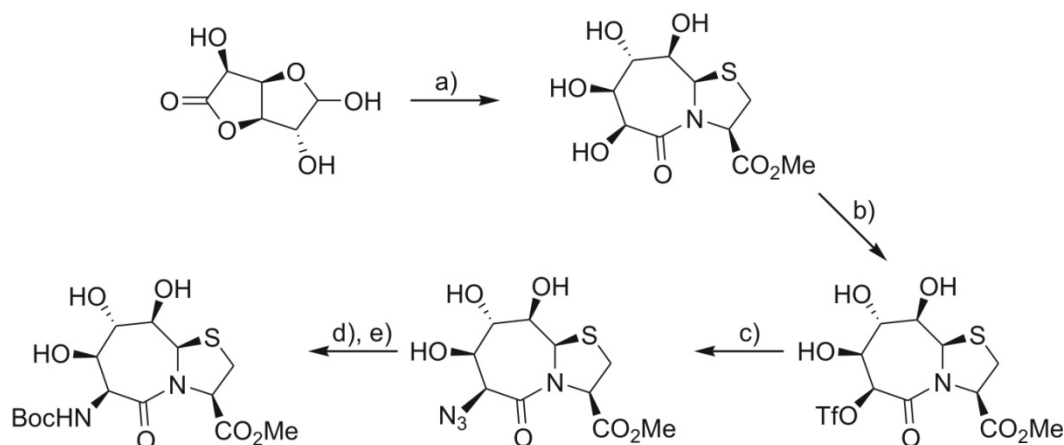


Abbildung 15 Alternative Synthese des 7,5-bityklischen Dipeptidmimetikums. a) L-Cys-OMe, H₂O/Pyridin, b) Tf₂O, Pyridin, c) NaN₃, DMF, d), e) Reduktion mit Pd/C, H₂, Boc₂O, DIPEA.

erfolgte die Kondensation in Wasser/Pyridin, anschließend wurde mit Tf₂O aktiviert und gegen ein Azid unter Retention ausgetauscht. Die abschließende Reduktion mit Wasserstoff und Palladium/Kohle sowie die Carbamat-Schätzung mit Boc₂O lieferten das 7,5-bityklische Dipeptidmimetikum (Abbildung 15).^[55, 56]

Durch Synthese und Konformationsanalyse zyklischer Hexapeptide des 7,5-bityklischen Dipeptidmimetikums konnte nachgewiesen werden, dass dieses in der Lage war die i und i+1te Position eines β -turns zu besetzen. Durch die gestreckte Konformation konnte der Dipeptidbausteins nicht die relevanten Positionen i+1 und i+2 eines β -turns besetzen. Jedoch konnte dieser als konformativ eingeschränktes Mimetikum beispielsweise in der PPII-Helix des Collagens erfolgreich eingesetzt werden.^[57, 58]

Ähnlich dem 7,5-bizyklischen Dipeptidmimetikum in Abbildung 15 konnte durch Kondensation von Mannurono-3,6-lacton mit L-Cysteinmethylester ein weiteres uronsäurebasiertes Dipeptidmimetikum dargestellt werden. Die Kondensation erfolgte in Methanol/Pyridin anstelle von Wasser Pyridin, da sich der Methylester des Thiazolidinlactams als sehr hydrolyseempfindlich erwies. Zwei der vier freien Hydroxylgruppen wurden als Acetal geschützt, daraufhin wurde mit MsCl aktiviert und die verbleibende Hydroxylgruppe als Benzylether geschützt. Der Austausch von Mesyl gegen ein Azid in DMF lieferte das geschützte 7,5-bizyklischen Dipeptid (Abbildung 16, links unten).

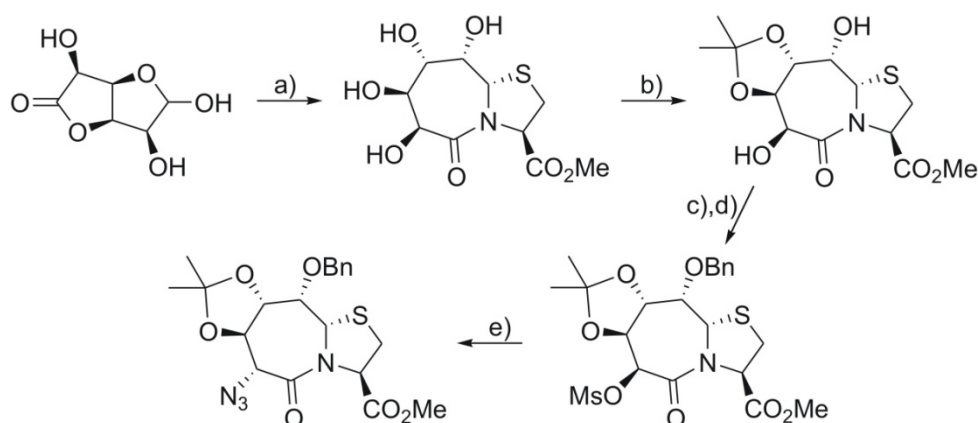


Abbildung 16 Synthese des des 7,5-bizyklischen Dipeptidmimetikums ausgehend von Mannurono-3,6-lacton. a) L-Cys-OMe, MeOH/Pyridin, b) DMP, pTsOH, c) MsCl, NEt₃, d) BnBr, NaH, e) NaN₃, DMF.

Entsprechend des vorherigen 7,5-bizyklischen Dipeptidmimetikums belegte auch das in Abbildung 16 gezeigte Mimetikum ausschließlich die i und i+1te Position eines β -turns. Auch hier wurde eine gestreckte Konformation des Dipeptidbausteins nachgewiesen.^[59]

Ausgehend von Glukuronsäure konnte in der Arbeitsgruppe Geyer weiterhin ein Pyridon-Dipeptidbaustein dargestellt werden, welcher als *Backbone-Chromophor* erfolgreich eingesetzt werden konnte. Durch Periodatspaltung des Glukuronsäurelactons konnte das Arabinurono-2,5-lacton dargestellt werden, welches im Weiteren zu einem 6,5-bizyklischen Thiazolidinlactam kondensierte. Die Aktivierung mit Tf₂O, die Einführung eines Azids sowie die anschließende Reduktion und Carbamat-Schützung ergaben den in Abbildung 17 unten rechts gezeigten Dipeptidbaustein. Durch die Aktivierung der verbleibenden freien Hydroxylgruppen mit MsCl und gleichzeitiger Baseneinwirkung wurde der Pyridon-Dipeptidbausteins (Abbildung 17, unten links) erhalten.^[60]

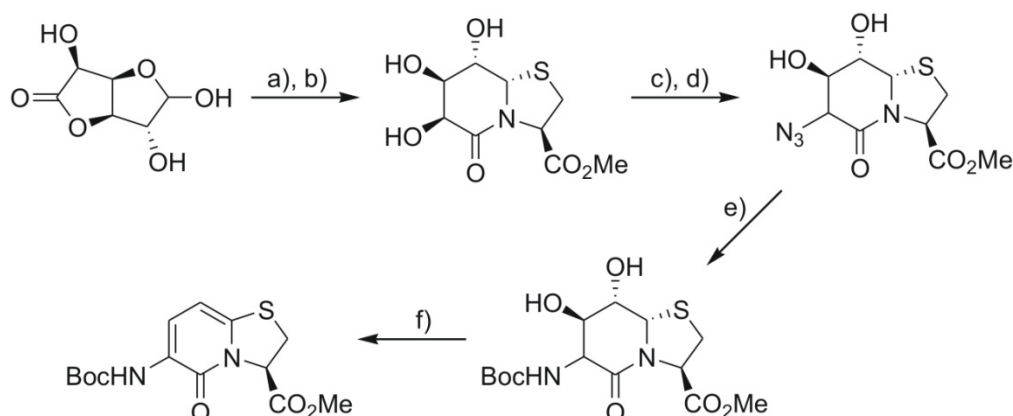


Abbildung 17 Synthese des Pyridon-Dipeptidbausteins. a) NaIO_4 , NaHPO_4 , b) L-Cys-OMe, H_2O /Pyridin, c) TiCl_4 , Pyridin, d) NaN_3 , DMF, e) Reduktion mit Pd/C , H_2 , Boc_2O , DIPEA, f) MsCl , NEt_3 .

Es zeigte sich, dass auch der Pyridon-Dipeptidbaustein aufgrund seiner gestreckten Konformation nicht in der Lage war, die $i+1$ und $i+2$ Positionen eines β -turns zu besetzen; allerdings konnte der Dipeptidbaustein sehr erfolgreich im C-terminalen Fragment des Neuropeptid Y eingesetzt werden. Hierbei zeigte sich die schrittweise konformative Einschränkung des Peptids sowie die daraus resultierende Veränderung der Rezeptor Subtypselektivität unter Verwendung des Pyridon-Dipeptidbausteins.^[61]

Neben den hier angeführten Beispielen wurden weitere 5,5- und 6,5-bizyklische Thiazolidinlactame in der Arbeitsgruppe Geyer hergestellt.^[62, 63] Alle diese Mimetika zeigten ein stark konformativ eingeschränktes Rückgrat, jedoch konnte bisher keine dieser Verbindungen einen β -turn an den Positionen $i+1$ und $i+2$ stabilisieren.

2 Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Hybridstrukturen aus Proteinen und einem Dipeptidmimetikum darzustellen und zu charakterisieren. Damit verbunden war die Aufgabe, die bisherigen Probleme bekannter Dipeptidmimetika, wie beispielsweise die schlechte Verfügbarkeit im Multigrammmaßstab, die unzureichende konformative Stabilität sowie das bei der Festphasensynthese auftretende Problem der zu hohen Polarität, zu umgehen.

Dafür bot sich an, ein auf D-Ribose und L-Cystein-methylester basierendes Thiazolidinlactam (Abbildung 18) zu einem Dipeptidbaustein umzusetzen. Es wurde erwartet, dass diese hochsubstituierte Verbindung aufgrund des cis-Diols eine

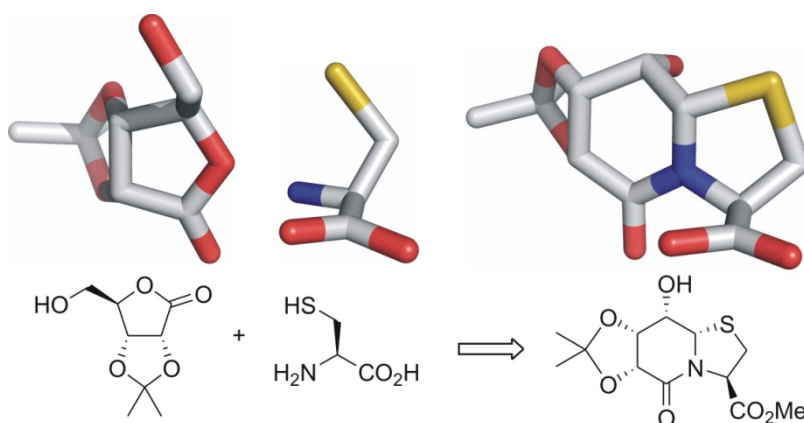


Abbildung 18 Schematische Darstellung des 6,5-bizyklischen Thiazolidinlactams auf der Basis von D-Ribose und L-Cystein. Für die Umsetzung wird D-Ribonolacton verwendet, welches in zwei Stufen aus Ribose zugänglich ist.^[64]

sehr hohe konformative Stabilität aufweisen sollte. Damit die Verwendbarkeit des Dipeptidbausteins als Fmoc-geschützte Aminosäure in der automatisierten Festphasensynthese gewährleistet werden konnte, musste dieser eine möglichst geringe Polarität aufweisen. Daher sollte das cis-Diol gezielt geschützt werden, um eine Kompatibilität seitens der Festphasensynthese zu erreichen. In diesem Zusammenhang sollte weiterhin die Stabilität während der Lagerung, unter Peptidkupplungs- sowie unter Abspaltbedingungen überprüft werden. Entsprechend früherer Arbeiten sollten durch die Synthese und Konformationsanalyse zyklischer Modellpeptide erste Aussagen bezüglich der konformativen Eigenschaften des Dipeptidmimetikums gewonnen werden.^[57, 59] Zur weiteren Analyse des vorliegenden Dipeptidbausteins sollte daraufhin ein Vergleich mit bekannten β -turn-Mimetika stattfinden.

Wie auch bei bereits untersuchten Dipeptidbausteinen sollte die Zielverbindung dieser Arbeit in verschiedene Sequenzen, welche für die medizinische Chemie relevant sind, inkorporiert werden und die damit verbundenen strukturellen Auswirkungen untersucht werden. Um die Darstellung hybrider Proteinstrukturen zur Untersuchung des Dipeptidbausteins im Kontext größerer biologisch aktiver Verbindungen zu erreichen, sollte durch die kooperative Faltung mehrerer einzelner Peptide die Größenordnung eines Proteins erreicht werden. Da geplant war, diese Peptide mittels Festphasensynthese herzustellen, sollte sich die Länge der Sequenzen in einer synthetisch gut zugänglichen Größenordnung von maximal 50 Aminosäuren bewegen.

3 Struktur und Synthese

3.1 Synthese bizyklischer Dipeptidbausteine

3.1.1 Darstellung des 6,5-bizyklischen Thiazolidinlactams (2)

Die hoch diastereoselektive Kondensation von Uronsäurederivaten mit L-Cysteinmethylester zu Thiazolidinlactamen wurde in der Arbeitsgruppe *Geyer* bereits für diverse Zuckerkonfigurationen erfolgreich durchgeführt. Beispielhaft können hier D-Glucurono-3,6-lacton, D-Mannurono-3,6-lacton oder D-Arabinurono-2,5-lacton genannt werden.

Im Rahmen der vorangegangenen Diplomarbeit wurde ein Zugang zu einem neuen 6,5-bizyklischen Thiazolidinlactam entwickelt. Die Synthese geht hierbei von D-Ribonolacton **(1)** aus, welches in einer zweistufigen Synthese ausgehend von D-Ribose dargestellt werden kann.^[64]

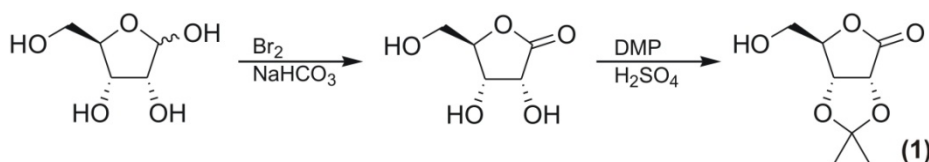


Abbildung 19 Darstellung von 2,3-O-Isopropyliden-D-Ribonolacton (**1**). Die Oxidation mittels Brom erfolgt in NaHCO₃-gepufferter Lösung, die anschließende Acetalisierung wird mit 2,2-Dimethoxypropan erreicht.

Für die Kondensation musste vorausgehend eine Oxidation des Ribonsäure-Derivats zum C5-Aldehyden, in diesem Fall zur L-Riburonsäure, stattfinden. Die Oxidation mit Dess-Martin-Periodinan, einem milden und nicht toxischen Oxidationsmittel, führte erfolgreich zur gewünschten Uronsäure. Es zeigte sich jedoch, dass verbleibende Reste des Dess-Martin Reagenzes, welche aufgrund ihrer Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln nur schlecht abgetrennt werden konnten, sowie die entstehende Essigsäure, die Ausbeute der Kondensationsreaktion negativ beeinflussten.

Daher wurde anstelle des Dess-Martin Reagenzes im Weiteren ausschließlich IBX für die Oxidation zur L-Riburonsäure verwendet. Der Vorteil liegt darin, dass IBX bei Raumtemperatur weitestgehend unlöslich in organischen Lösungsmitteln ist, jedoch unter erhöhter Temperatur eine geringe Löslichkeit aufweist, welche ausreicht, um den gewünschten Alkohol zum Aldehyden zu oxidieren.^[65]

Somit war es möglich D-Ribonolacton in Acetonitril bei 80 °C mit IBX zum Uronsäurederivat in Abbildung

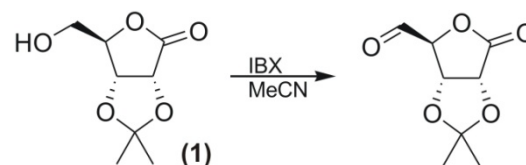


Abbildung 20 Oxidation des D-Ribonolactons zum L-Riburonolacton mit IBX in Acetonitril bei 80 °C.

20 zu oxidieren, anschließendes Abkühlen des Ansatzes und Filtration ergaben die gewünschte L-Riburonsäure ohne störende Verunreinigungen. Zur Darstellung von IBX hatte sich die Synthese nach *Frigerio et al.* bewährt (Abbildung 21).^[66] Hierbei findet die Oxidation der 2-Iodbenzoesäure mittels Oxone®, einer kommerziell erhältlichen Salzmischung aus KHSO₅, KHSO₄ und K₂SO₄, in Wasser statt. Dieses Verfahren hat im Gegensatz zur ursprünglichen Synthese in der die Oxidation mit

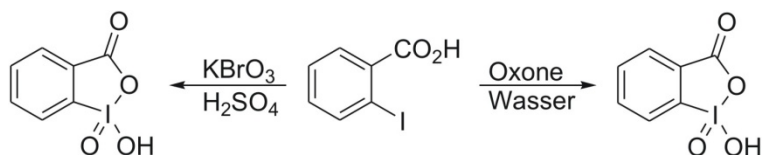


Abbildung 21 Mögliche Darstellungsvarianten für IBX ausgehend von 2-Iodbenzoesäure. Die Verwendung von Kaliumbromat und Schwefelsäure zur Oxidation erweist sich als nachteilig, da hierbei zum Einen Brom freigesetzt wird und zum Anderen die Gefahr der explosionsartigen Zersetzung des IBX aufgrund von Verunreinigungen besteht.

Kaliumbromat in Schwefelsäure erfolgte den Vorteil, dass das IBX frei von Verunreinigungen ist, welche eine explosionsartige Zersetzung hervorrufen können.^[67] Zwar wird die Ausbeute des IBX durch die Verwendung von

Oxone® verringert, dem gegenüber steht aber eine sehr viel zeitsparendere Durchführung der Synthese sowie eine verbesserte Handhabung.

Die anschließende Kondensation der L-Riburonsäure mit L-Cysteinmethylester·HCl, welche unter Sauerstoffausschluss zur Vermeidung der Cystinbildung durchgeführt wurde, verlief in sehr guten Ausbeuten. Das 6,5-bizyklische

Thiazolidinlactam (**2**) konnte dabei diastereomerenrein erhalten werden (Abbildung 22). Es zeigte sich, dass eine

Verlängerung der Reaktionszeit von vier auf 14 Tage und ein anschließendes Erhitzen des Ansatzes

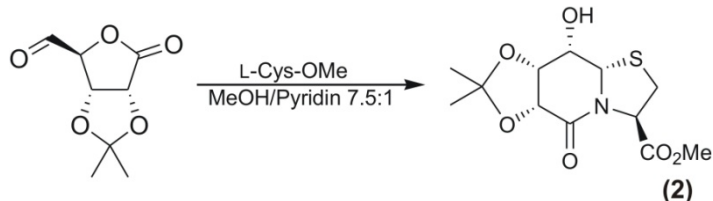


Abbildung 22 Die Kondensation von L-Riburonolacton mit L-Cysteinmethylester·HCl in MeOH/Pyridin liefert die Verbindung (**2**) in sehr guten Ausbeuten (82% Oxidation und Kondensation).

über zwei Tage auf 50 °C die Ausbeute noch einmal erheblich steigerte. Auf eine weitere Aufreinigung nach dem Ausschütteln des Kondensationsprodukts konnte aufgrund der hohen Reinheit der Verbindung (**2**) verzichtet werden.

Um eine einheitliche Grundlage der Nomenklatur für alle nachfolgenden Thiazolidinlactame zu schaffen, soll anhand der in Abbildung 23 gezeigten Verbindung die Namensgebung erläutert werden. Beginnend mit dem Schwefelatom, welchem die Position 1 zugewiesen wird, verläuft die

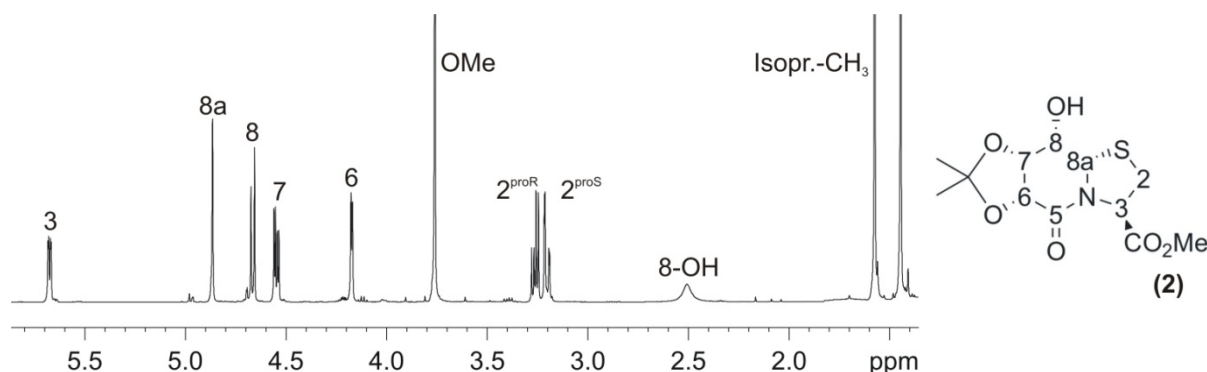


Abbildung 23 ¹H-NMR-Spektrum, 500 MHz, CDCl₃. Spektrum der Verbindung (**2**) inklusive der Zuordnung der Signale. Rechts: Beginnend mit dem Schwefelatom wird jedem Atom anhand des Thiazolidinlactamgerüsts im Uhrzeigersinn eine Zahl zugewiesen.

Nummerierung im Uhrzeigersinn über das Gerüst des Thiazolidinlactams. Dem Brückenkopf wird jedoch aus Gründen der Analogie zu früheren Arbeiten nicht die Position 9, sondern 8a zugewiesen.

Die Substituenten der jeweiligen Positionen werden entsprechend des Grundgerüsts bezeichnet, wie zum Beispiel 8-OH für die freie Hydroxylgruppe in Abbildung 23. Im Weiteren kann eine prochirale Zuordnung der diastereotopen Methylengruppe an Position 2 getroffen werden, sofern dies spektroskopisch eindeutig möglich ist.

3.1.2 Synthese des Dipeptidbausteins Fmoc-Pli^P=Cat-OH (6)

Die anschließende Umacetalisierung vom 6,7- zum 7,8-Acetal (**3**) erfolgte säurekatalysiert mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan. Durch die Aktivierung mit Tf₂O in Dichlormethan und Pyridin konnte die Verbindung (**4**) erhalten werden. Die anschließende nukleophile Substitution mit Natriumazid in DMF lieferte (**5**) unter vollständiger Inversion an C6. Alle drei Reaktionen verliefen mit Ausbeuten von mindestens 92% und konnten aufgrund der hohen Reinheit durch Kristallisation aufgereinigt werden. Besonders interessant

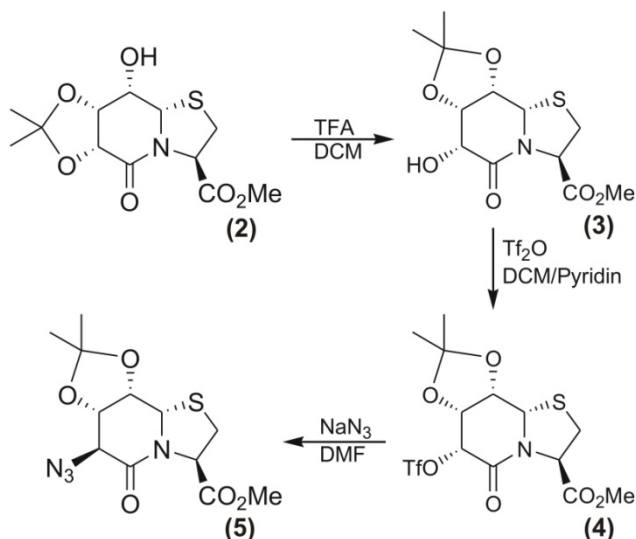


Abbildung 24 Reaktionssequenz der Umlagerung (95%), der anschließenden Aktivierung als Triflat (92%) und zuletzt der Austausch unter S_N2-Bedingungen gegen Natriumazid (95%).^[68]

ist bei dieser Reaktionssequenz die Umacetalisierung. Diese ist insofern ungewöhnlich, da erwartungsgemäß das Acetal an der 6-/7-Position elektronisch besser stabilisiert sein sollte, da die 6-OH aufgrund des benachbarten Carbonyls die elektronenärmste ist. Die Triebkraft der Umacetalisierung scheint jedoch nicht durch elektronische Effekte bedingt zu sein, sondern durch

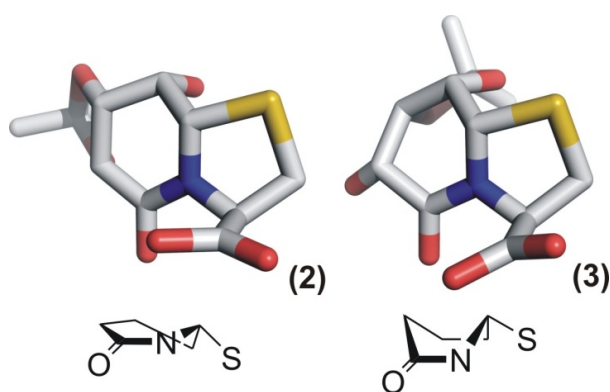
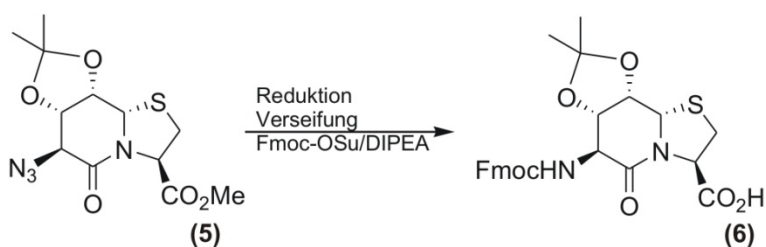


Abbildung 25 Berechnete Konformationen des Thiazolidinlactams vor und nach der Umacetalisierung sowie die jeweilige schematische Darstellung. Die rechte Struktur stützt sich auf die Kristallstrukturen späterer Derivate, die linke wurde entsprechend der vorliegenden Kopplungskonstanten berechnet.

Konformative. Die Betrachtung der ³J-Kopplungskonstanten des Dipeptidbausteins vor und nach der Umacetalisierung zeigt, dass eine deutliche Veränderung der Konformation stattgefunden hat. Die Konformationen vor und nach der Wanderung des Acetals sind in Abbildung 25 dargestellt. Die linke der beiden Strukturen basiert auf den Kopplungskonstanten und den daraus resultierenden Torsionswinkel der Verbindung (**2**), die rechte Struktur stützt sich auf die Kristallstrukturen späterer Derivate.

Wahrscheinlich ist also der konformative Wechsel von einer *envelope*- zu einer Wannen-

Konformation. Die treibende Kraft ist hierbei die streng axiale Anordnung der Hydroxylgruppen im Acteal sowie die planare Anordnung des Amids, welche



durch die Torsionswinkel der Atome C6-C5-N-C8a sowie C6-C7-C8-C8a bilden hierbei jeweils eine Torsion von 0° aus, aus der die Stabilisierung resultiert. Zuletzt wird die Verbindung **(5)** mit Wasserstoff und Palladium auf Kohle reduziert, der Methylester basisch hydrolysiert und das freie Dipeptid mit Fmoc-OSu oder Fmoc-Cl N-terminal geschützt.

Abbildung 26 Zur Nutzung des Dipeptidbausteins in der Festphasensynthese muss dieser zuerst vollständig geschützt und anschließend als Fmoc-Aminosäure **(6)** geschützt werden (drei Stufen, insgesamt 86%).

Die Gesamtausbeute zur Darstellung des Dipeptidbausteins **(6)** beträgt 58% und beläuft sich auf acht Stufen ausgehen vom D-Ribonolacton. Die Synthese kann im Multigrammmaßstab ohne Einschränkungen hinsichtlich der Ausbeuten durchgeführt werden. Im Bezug auf frühere Arbeiten und zur Erleichterung der Nomenklatur wurde der Dipeptidbaustein in Anlehnung an den Dreibuchstabencode für Aminosäuren mit der Bezeichnung „Pli=Cat“ (lat. *plicare* – beugen) versehen. Der Index P bei Pli^P=Cat wird dabei jedes Mal angeführt, sofern die Verbindung acetalgeschützt ist, die Bezeichnung des freien Dipeptids lautet ausschließlich Pli=Cat.

Die Gesamtausbeute zur Darstellung des Dipeptidbausteins **(6)** beträgt 58% und beläuft sich auf acht Stufen ausgehen vom D-Ribonolacton. Die Synthese kann im Multigrammmaßstab ohne Einschränkungen hinsichtlich der Ausbeuten durchgeführt werden. Im Bezug auf frühere Arbeiten und zur Erleichterung der Nomenklatur wurde der Dipeptidbaustein in Anlehnung an den Dreibuchstabencode für Aminosäuren mit der Bezeichnung „Pli=Cat“ (lat. *plicare* – beugen) versehen. Der Index P bei Pli^P=Cat wird dabei jedes Mal angeführt, sofern die Verbindung acetalgeschützt ist, die Bezeichnung des freien Dipeptids lautet ausschließlich Pli=Cat.

3.1.3 Betrachtung der konformativen Stabilität verschiedener Thiazolidinlactame

Dass das Gerüst aus Fünf- und Sechsring des Thiazolidinlactams nach der Umacetalisierung der Isopropylidengruppe nur äußerst geringen konformativen Veränderungen unterliegt, konnte anhand verschiedener Kristallstrukturen belegt werden. Diese sind in Abbildung 27 dargestellt: **(4)** (links), **(5)**

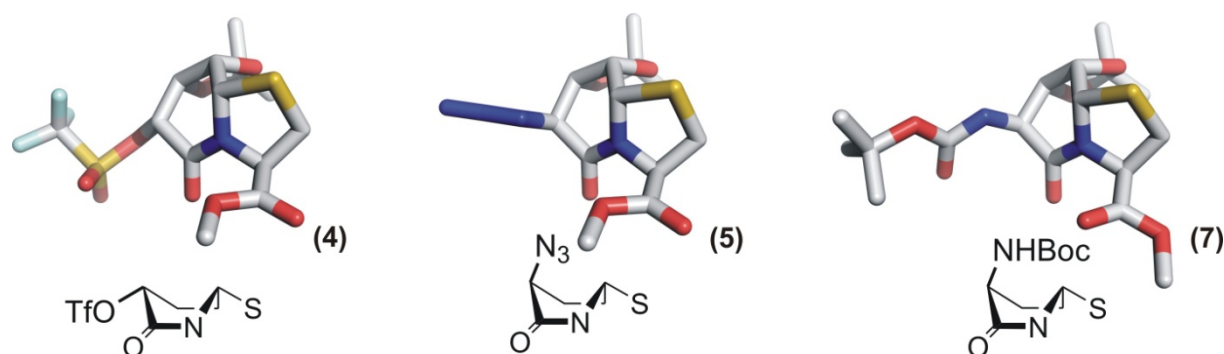


Abbildung 27 Darstellung der Kristallstrukturen der Verbindungen **(4)** (links), **(5)** (mitte) und **(7)** (rechts). Zu erkennen ist die Beibehaltung der Konformation von Fünf- und Sechsring über alle Stufen.

(mitte) und **(7)** (rechts). Gut zu erkennen ist die folgende Sequenz (von links nach rechts): Aktivierung als Triflat, O-/N-Austausch durch Natriumazid unter Inversion und zuletzt Reduktion des Azids und Einführung einer Carbamatschutzgruppe. Besonders auffallend ist hierbei, dass die Inversion des Stereozentrums durch die S_N2-Reaktion mit Natriumazid keinen erkennbaren Einfluss auf die

Konformation des trizyklischen Systems ausübt. Ebenso scheint der zusätzliche räumliche Anspruch des Carbamats die Konformation des Bicyklus nicht zu beeinflussen. Bereits die Umacetalisierung hatte einen Hinweis auf die erhöhte Stabilität der Wannen-Konformation durch die im Acetal axial angeordneten Hydroxylgruppen gegeben. Weiterhin wird die Konformation durch die amidische Bindung stabilisiert, da auch dieses in der vorliegenden Konformation eine Torsion nahe 0° aufweist. Daher scheint die Wannen-Konformation trotz der *gauche-gauche* Wechselwirkung begünstigt zu sein, so dass diese auch durch sterische Einflüsse nicht aufgehoben wird.

Tabelle 2 Auflistung der Kopplungskonstanten der Verbindungen (4), (5) und (7) zur Verdeutlichung der konformativen Stabilität.

	$^3J_{2H^{proR},3H}$	$^3J_{2H^{proS},3H}$	$^3J_{8aH,8H}$	$^3J_{8H,7H}$	$^3J_{7H,6H}$
(4)	6.6 Hz	1.3 Hz	2.0 Hz	7.6 Hz	3.4 Hz
(5)	5.7 Hz	1.6 Hz	2.0 Hz	7.2 Hz	2.3 Hz
(7)	6.1 Hz	1.5 Hz	2.0 Hz	7.2 Hz	2.2 Hz

Neben der Konformation im Kristall deuten die spektroskopischen Daten der Verbindungen in Lösung ebenfalls auf eine einheitliche Konformation hin. So zeigt die Betrachtung der Kopplungs-

konstanten von Fünf- und Sechsring der verschiedenen Derivate das Vorliegen einer hohen konformativen Stabilität, da nur geringfügige Unterschiede zu beobachten sind. Die einzelnen Kopplungskonstanten sind in Tabelle 2 aufgeführt, beispielhaft sind an dieser Stelle nur die Daten der Thiazolidinlactame aufgelistet, deren Kristallstrukturdaten zuvor gezeigt wurden. Auch die Betrachtung aller weiteren Verbindungen, welche in Analogie zu den Vorherigen acetalgeschützt sind, liefert keinen Anhaltspunkt für ein Abweichen von der beschriebenen Konformation. Interessant seitens des O-/N-Austausches unter Inversion ist die geringe Auswirkung hinsichtlich der 3J -Kopplungskonstante zwischen den 6- und 7-Protonen. Diese unterliegt gerade einmal einer Veränderung von 1.1 Hz, was dazu veranlassen würde, einen Austausch unter Retention zu

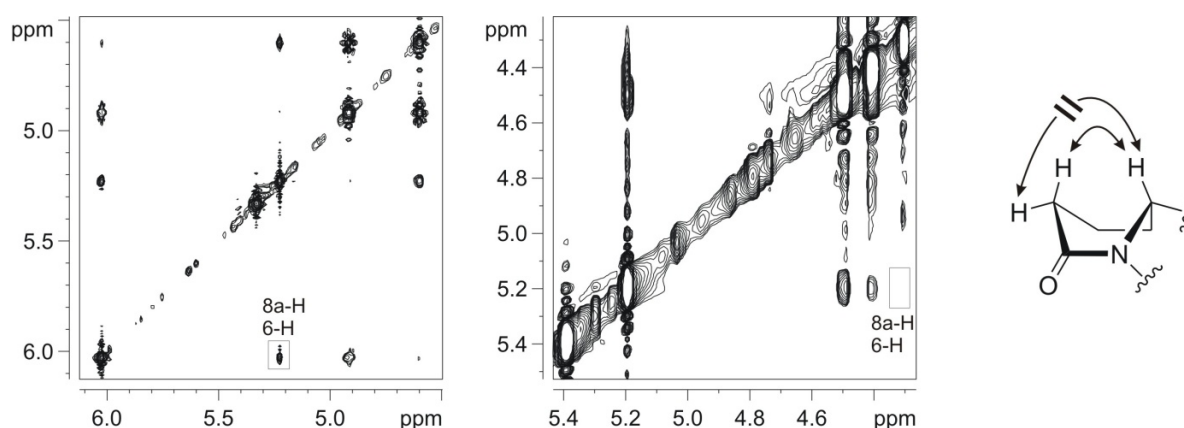


Abbildung 28 ROESY-Spektrum, 600 MHz, DMSO. Links: Spektrum des Triflats (4), in welchem der Kontakt zwischen Brückenkopfproton und 6-H gut zu erkennen ist. Mitte: Spektrum des Azids (5), nach der Inversion des Stereozentrums ist kein ROE zwischen dem 6-H und 8a-H detektierbar. Rechts: Modell zur Verdeutlichung der Kontakte in einer Wannen-Konformation.

vermuten. Die ROESY-Spektren in Abbildung 28 zeigen jedoch deutlich, was durch die Kristallstrukturen bereits erkennbar war, nämlich dass der ROE-Kontakt zwischen dem Brückenkopf-

und dem 6-Proton nur im Fall des Triflats zustande kommt. Die *flagpole*-Anordnung der beiden Protonen lässt nur für das axial konfigurierte Proton diese Wechselwirkung zu.

Die außerordentlich hohe Stabilität, die einfache Synthese im Multigrammmaßstab und die Handhabung von Pli=Cat, heben diesen Dipeptidbaustein von den bisher bekannten Beispielen hervor.

3.2 Anwendung von Pli=Cat in der Peptidsynthese

3.2.1 Darstellung synthetischer Peptide

Die Darstellung eines Peptids durch Kondensation von Aminosäuren kann durch Kupplung in Lösung oder an der Festphase erfolgen. Beide Verfahren sind grundsätzlich gleichermaßen gut geeignet um einen Peptidkupplung durchzuführen, unterscheiden sich aber hinsichtlich einiger Anforderung bzw. der Praktikabilität. Die Synthese der im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Peptide erfolge, sofern nur kleinere Mengen des Peptids benötigt wurden, mittels Festphasensynthese in automatisierter Form an einem Peptidsynthesizer oder manuell an 2-Chlorotrityl-Harz. Bei Ansatzgrößen >0.3 mmol wurde meist auf Fragmentkupplungen in Lösung zurückgegriffen.

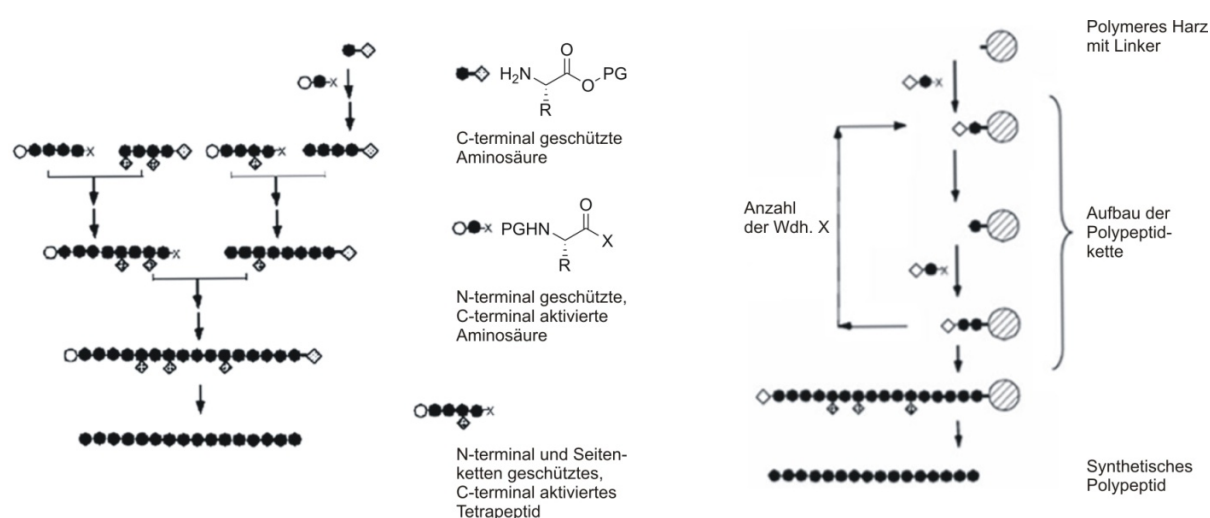


Abbildung 29 Schematische Darstellung der Fragmentkupplung in Lösung und der Festphasensynthese nach [1]. Links: Klassische Peptidkupplung in Lösung. Die Seitenketten sowie N- oder C-Terminus sind geschützt und die Fragmente werden gezielt zur Reaktion gebracht. Rechts: Allgemeiner Ablauf der Festphasensynthese, nach Anknüpfung auf einen polymeren Träger wird die Peptidkette schrittweise durch Entschützen und Kuppeln verlängert.

Die Idee einen polymeren Träger für die Synthese zu wählen, welcher in den notwendigen Lösungsmitteln nicht löslich, diesen aber zugänglich ist, wurde ursprünglich von Merrifield entwickelt.^[69] Dabei wird das Peptid vom C- zum N-Terminus hin durch sich wiederholende Sequenzen aus Kupplungen und Abspaltung der Schutzgruppen aufgebaut. Der Vorteil der Festphasensynthese liegt darin, dass nach jedem Reaktionsschritt nicht umgesetzte Reagenzien durch Filtration bzw. Waschen des Harzes entfernt werden können. Die Festphasensynthese erlaubt die Darstellung von Polypeptidketten bis zu einer Länge von etwa 50 Aminosäuren, darüber hinaus

ist die Synthese an der Festphase nur noch unter optimierten Bedingungen möglich. Der größte Vorteil der festphasengebundenen Synthese besteht in der Möglichkeit zur Automation der Abläufe, damit wird der schnelle Zugang zu hohen Polypeptidkettenlängen ermöglicht. Das Hauptproblem bei längeren Peptiden bilden die harzgebundenen Verunreinigungen, welche durch unvollständige Reaktionen oder geringfügige Verunreinigungen der Lösungsmittel, Reagenzien oder der geschützten Aminosäurebausteine entstehen.^[1] Diese unterscheiden sich im Allgemeinen nur geringfügig von dem gewünschten Produkt und sind daher nur schwer zu entfernen. Ein weiterer Nachteil der Festphasensynthese kommt durch die hohe Anzahl an benötigten Äquivalenten von Aminosäuren und Reagenzien zustande, welche benötigt werden, um einen vollständigen Umsatz zu erreichen.^[70-72]

Die Darstellung von Peptiden durch Kupplung in Lösung ist besonders bei kurzen Polypeptiden von Vorteil, da die sich die benötigte Menge an Reagenzien auf sehr geringe Überschüsse reduziert. Weiterhin kann jeder Kupplungsschritt seitens seiner Zwischenprodukte charakterisiert werden, wodurch eine bessere Kontrolle der Reaktionsbedingungen gegeben ist. Ebenfalls von Vorteil ist die Variabilität der Ansatzgröße, besonders im Hinblick auf die automatisierte Festphasensynthese, welche oftmals im Bereich von 0.1 millimolaren Ansätzen arbeitet. Nachteilig hingegen ist die

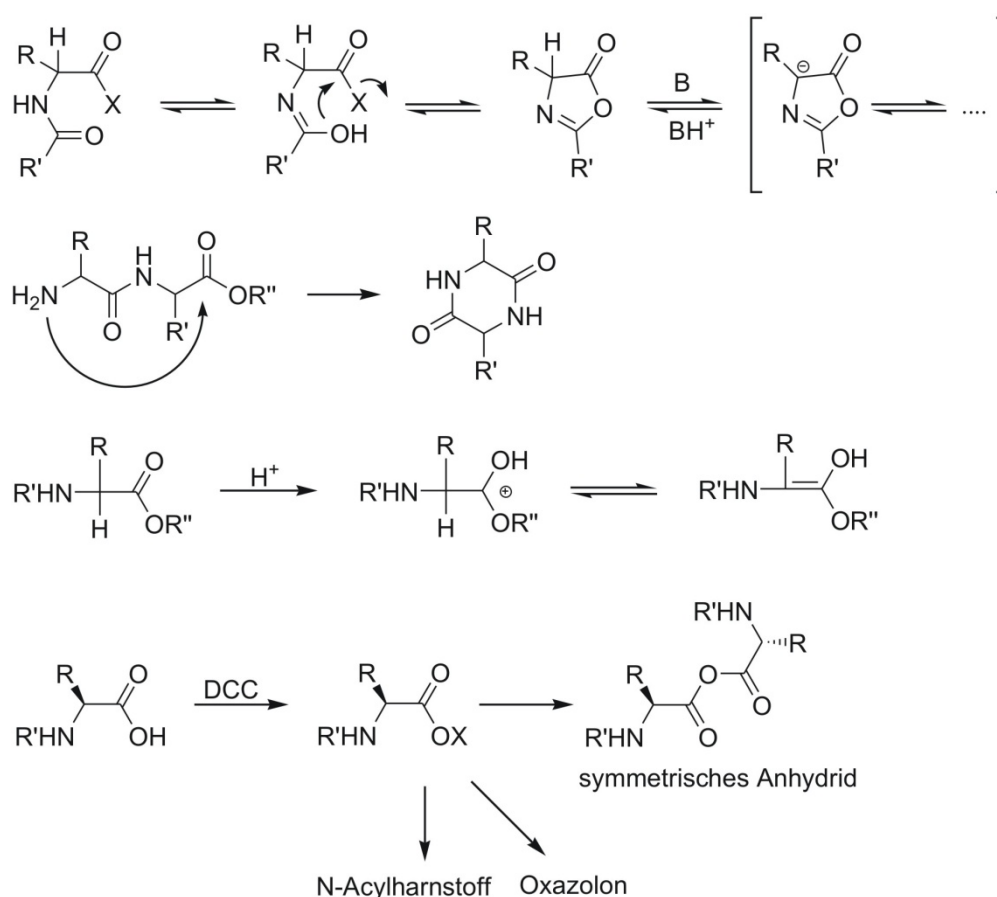


Abbildung 30 Von oben nach unten: Oxazolidinon-Bildung; Bildung eines Diketopiperazins, ausgehend von einem Dipeptidester; Racemisierung; Überaktivierung.^[73]

Aufarbeitung der Reaktionsmischungen, welche bei der Kupplung in Lösung anfallen. Problematisch ist hierbei vor allem die teilweise sehr schlechte Löslichkeit vollständig geschützter Peptide. Ein weiteres Problem ist die Racemisierung der C-terminalen Aminosäure während der Kupplung durch eine intermediäre Oxazolidinonbildung oder einen reversiblen α -Protonenentzug.^[3] Daher ist es von Vorteil bei der Fragmentkupplung von N-geschützten Peptidfragmenten Glycin oder Prolin als C-terminale Aminosäure zu wählen. Prolin zum einen ist nicht in der Lage, ein Oxazolidinon zu bilden, Glycin zum anderen besitzt kein Stereozentrum an der α -Position, wodurch eine Epimerisierung ausgeschlossen werden kann. In Abbildung 30 sind kurz die häufigsten Probleme, die während einer Peptidsynthese auftreten können, dargestellt.^[74-76]

Hinsichtlich der konformativen Untersuchung eignen sich zyklische Peptide besonders gut als Modellverbindungen, da durch die Zyklisierung der Peptidkette deren Freiheitsgrade und damit verbunden die Beweglichkeit stark eingeschränkt wird.^[29, 78-81] Eine Möglichkeit der Zyklisierung besteht in der Aktivierung mittels Diphenylphosphorsäureazid, hierbei wird die freie Säure des Hexapeptids in ein Säureazid überführt, welches daraufhin vom Amin des N-Terminus angegriffen werden kann. Aufgrund der relativ guten Abgangsgruppenqualität des Azids und der trotzdem

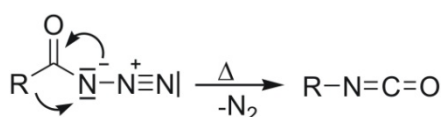


Abbildung 31 Möglicher Mechanismus der Curtius-Umlagerung. Durch thermische Zersetzung bildet sich ein Nitren welches aufgrund der Instabilität zum Isocyanat umlagert.^[77]

vorhandenen hohen Stabilität des Säureazids, funktioniert diese Methode zur Zyklisierung von Peptiden sehr gut. Wichtig ist aber, dass die Temperatur während der Zyklisierung möglichst niedrig gehalten wird, da ansonsten eine Curtius-Umlagerung stattfinden kann (Abbildung 31). Im Fall der Umlagerung kann ebenso eine Zyklisierung

stattfinden, jedoch entsteht anstelle des gewünschten Amids ein Harnstoffderivat. Das Auftreten einer Curtius-Umlagerung kann neben der NMR-Spektroskopie auch mittels Massenspektrometrie nachgewiesen werden, da die zyklischen Harnstoffe die Masse $M+15$ (M = Masse des gewünschten Zyklopeptids) aufweisen.

3.2.2 Synthese des zyklischen, C_2 -symmetrischen Peptids (12)

Zur Bestimmung der Konformation eines Dipeptidbausteins sowie dessen Positionen innerhalb eines β -turns eignen sich besonders gut zyklische Hexapeptide. In der Arbeitsgruppe Geyer konnten diese Modellverbindungen bereits mehrfach erfolgreich zur Untersuchung polyhydroxylierter Peptidmimetika herangezogen werden.^[57, 60] Daher sollte auch die konformative Auswirkung des vorliegende Dipeptidbausteins Pli=Cat mittels zyklischer Hexapeptide näher betrachtet werden.

Die Synthese des linearen Vorläufers der Verbindung **(12)** gelang erstmals während der Diplomarbeit mittels Festphasensynthese, da die so erhaltenen Mengen jedoch zu gering waren, um ausführlichere Untersuchungen durchführen zu können, musste die Synthese erneut durchgeführt werden. Um größere Mengen des Zyklopeptids zu erhalten, wurde der lineare Vorläufer mittels Kupplung in Lösung dargestellt. Dies erschien sinnvoll, da die Anzahl der notwendigen Stufen für die Darstellung eines Hexapeptids überschaubar waren und die Synthese durch Fragmentkondensation im Vergleich zur linearen Synthese nochmals verkürzt werden konnte. Es zeigte sich, dass die Verwendung der Verbindung **(5)** besonders gut als Ausgangsverbindung für die Darstellung von Peptiden, welche mindestens einen Dipeptidbaustein enthalten sollten, geeignet war. Zum einen war das Azid in großem Maßstab zugänglich, zum Anderen war die Polarität des Bausteins durch die Isopropylidenschützung des Diols so stark herabgesetzt, dass dieser in den meisten Lösungsmitteln problemlos gehandhabt werden konnte. Bei der in Abbildung 32 gezeigten Synthese konnte das Azid zusätzlich als orthogonale Schutzgruppe hinsichtlich des Methylesters und des Acetals verwendet werden. Die Verseifung mit 1N LiOH-Lösung erfolgte in einer Mischung aus 1,4-Dioxan und Wasser

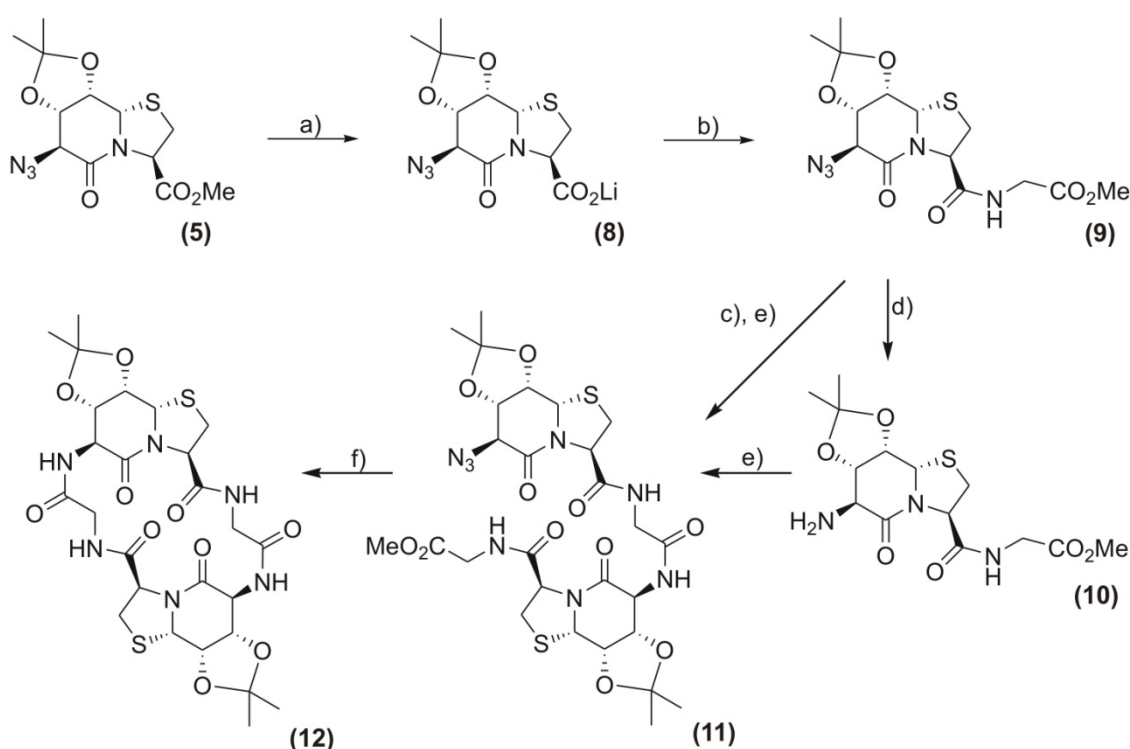


Abbildung 32 Synthese des zyklische Hexapeptids **(12)** ausgehend vom Azid **(5)**. a) Verseifen mit 1N LiOH in 1,4-Dioxan/H₂O, b) Kuppeln mit HBTU/HOBt und Glycinmethylester (83%), c) Verseifen mit 1N LiOH in 1,4-Dioxan/H₂O, d) Reduzieren mit Pd/C und H₂ (97%), e) Kuppeln mit HBTU/HOBt (49%), f) Reduzieren, verseifen (wie bereits beschrieben c,d)), anschließend zyklisieren mit DPPA/NaHCO₃ im DMF ($c = 10^{-3}$ mol/L) (49%).

oder in Methanol – es zeigte sich dabei, dass die Verwendung von 1,4-Dioxan Nebenreaktionen weitestgehend unterband und die Esterhydrolyse sehr viel schneller ablief.

Nach Zugabe der 1N LiOH-Lösung wurde für etwa 5-15 Minuten gerührt, anschließend wurde mittels 1N HCl bzw. stark saurem Ionentauscher neutralisiert, hierbei konnten im Hinblick auf anschließende

Reaktionen keine Unterschiede zwischen „salzfreiem“ und LiCl-haltigem Verseifungsprodukt **(8)** beobachtet werden. Die Kupplung mit Glycinmethylester wurde unter Standardbedingungen in DMF mit HBTU/HOBt und DIPEA als Base durchgeführt. Das so erhaltene Tripeptid **(9)** konnte nun einerseits wie bereits zuvor beschrieben verseift werden, ein anderer Teil wurde mittels Palladium auf Kohle und Wasserstoff zum Amin **(10)** reduziert. Die beiden so erhaltenen Peptidfragmente konnten mit HBTU/HOBt zum offenkettigen Hexapeptid **(11)** gekuppelt werden. Da bei dieser Fragmentkupplung Glycin als C-terminale Aminosäure verwendet wurde, konnte auf einfache Weise eine mögliche Epimerisierung verhindert werden. Reduktion und Verseifung des offenen Hexapeptids erfolgten entsprechend der Verbindung **(8)**, die anschließende Zyklisierung erfolgte in DMF unter hoher Verdünnung ($c = 10^{-3}$ mol/L) zur Vermeidung einer Oligomerenbildung. Als Zyklisierungsreagentien dienten DPPA und NaHCO_3 , der Vorteil des Hydrogencarbonats war hierbei, dass dieses aufgrund seiner geringen Löslichkeit als Bodensatz im DMF vorlag und so die Deprotonierung des als Ammoniumion-vorliegenden N-Terminus nur langsam stattfand. Dadurch wurde zusätzlich erreicht, dass stets nur sehr wenig reaktionsfähigen Peptids im Ansatz vorhanden war, was die Bildung von Oligomeren noch weiter herabsetzte.

Die Aufreinigung des Peptids erfolgte im Fall der Verbindung **(12)** durch mehrfaches suspendieren und abzentrifugieren des Rückstandes der Zyklisierungsreaktion in Wasser und Methanol. Bezogen auf das lineare Hexapeptid konnten 53% des aufgereinigten Produkts erhalten werden, was einer außerordentlich guten Ausbeute für eine solche Reaktion entspricht. Zuletzt wurde das Hexapeptid noch vollständig durch die Behandlung mit TFA/Wasser entschützt (Abbildung 33). Die Umsetzung

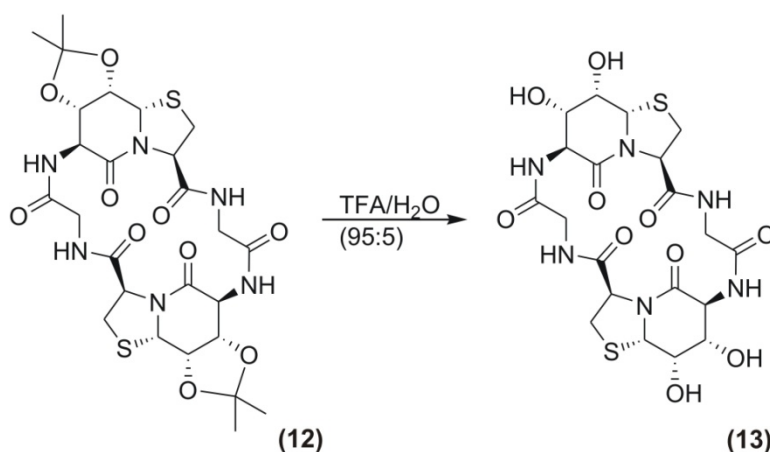


Abbildung 33 Entschützung des zyklischen Hexapeptids **(12)** mittels TFA/Wasser. Das Entfernen des Acetals verläuft quantitativ und liefert das gewünschte Produkt in sehr hoher Reinheit, so dass auf eine weitere Aufreinigung verzichtet werden kann.

hierbei verlief quantitativ und lieferte das freie Zyklopeptid in sehr hoher Reinheit, so dass auf eine weitere Aufreinigung verzichtet werden konnte.

3.2.3 Konformationsanalyse der Zyklopeptide (12) und (13)

Zur Analyse der Modellpeptide wurden diese mittels NMR-Spektroskopie hinsichtlich ihrer Konformation untersucht. Die Betrachtung der ROESY-Spektren der beiden Verbindungen zeigte,

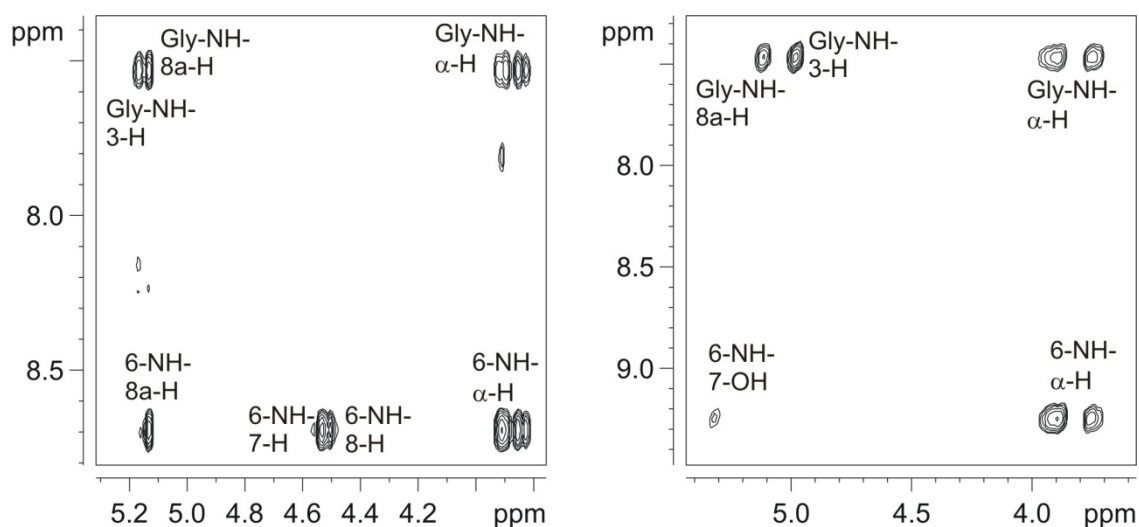


Abbildung 34 ROESY-Spektrum, 600 MHz, DMSO_{d6}. Links das geschützte Modellpeptid (12), rechts die entschützte Verbindung (13). Einen Hinweis auf die Orientierung der amidischen Protonen liefert beispielsweise der ROE-Kontakt zwischen dem Glycin-NH und dem Brückenkopfproton des Dipeptidbausteins. Da dieser in beiden Spektren sehr stark ist, muss das amidische Proton des Glycins zum Inneren des Zyklopeptids orientiert sein, da nur so die notwendige räumliche Nähe möglich ist.

dass sich die Orientierung der amidischen Protonen nicht wesentlich verändert hatte. Dieses konnte besonders gut durch den ROE-Kontakt zwischen dem Glycin-NH und dem Brückenkopfproton von Pli=Cat belegt werden (Abbildung 34). Da dieser Kontakt in beiden Spektren eine ähnliche Signalstärke besaß, war davon auszugehen, dass die Orientierung trotz der Entschützung beibehalten wurde. Weiterhin konnte aufgrund des starken Kontakts auf eine Ausrichtung des amidischen Protons des Glycins zum Inneren des Zyklopeptids geschlossen werden. Nur so ist die räumliche Nähe der beiden Protonen gegeben, während eine externe Ausrichtung des Glycin-NHs ein Wegfallen des ROE-Kontakts bedeutet hätte. Durch die Bestimmung der Temperaturgradienten sollte versucht werden, zusätzliche Informationen hinsichtlich der Konformation der Zyklopeptide (12) und (13) zu gewinnen. Dazu wurden ¹H-NMR Spektren unter verschiedenen Temperaturen in DMSO aufgenommen (Abbildung 35). Als vorteilhafter Temperaturbereich erwies sich der Bereich zwischen 300 und 350 K, in Schritten von jeweils 10 K. Dadurch wurde gewährleistet, dass die Linearität der Temperaturgradienten überprüft werden und gleichzeitig die Dauer der Messung sehr kurz gehalten werden konnte. Es zeigte sich, dass die Verbindungen (12) und (13) ein sehr ähnliches Verhalten hinsichtlich der Temperaturabhängigkeit aufwiesen. Das amidische Proton des Glycins war jeweils vom Lösungsmittel stark abgeschirmt und zeigte eine sehr geringe Temperaturabhängigkeit, das Dipeptid-NH hingegen zeigte einen deutlichen Austausch mit dem Lösungsmittel, wobei der Temperaturgradient in der entschützten Verbindung (13) nochmals etwas größer war als in der

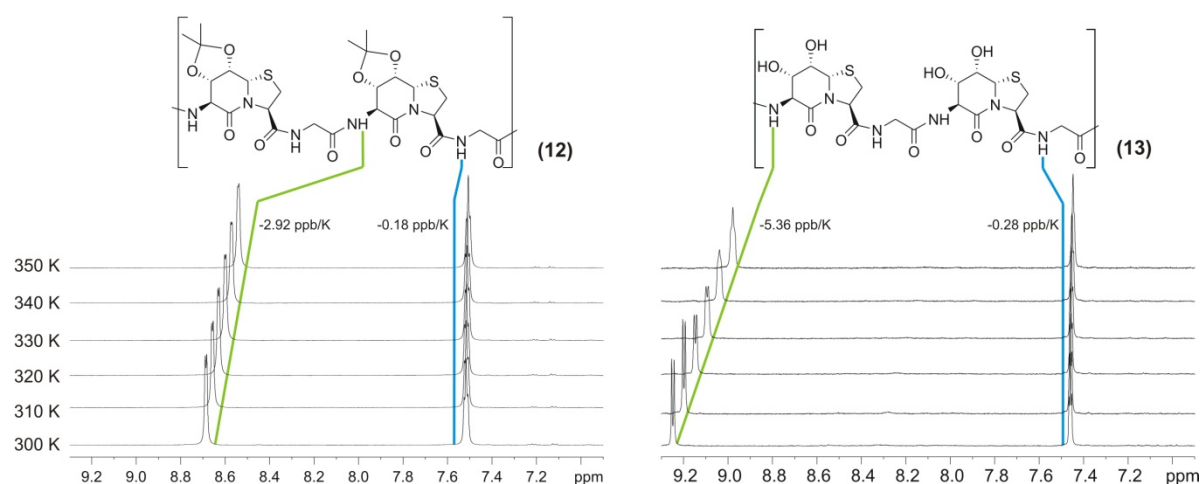


Abbildung 35 ^1H -NMR-Spektrum, 600 MHz, DMSO-d_6 , 300-350K. Dargestellt sind die ^1H -NMR-Spektren der Verbindungen (12)(links) und (13) (rechts) in Abhängigkeit von der Temperatur. Das amidische Proton des Glycins ist jeweils stark vom Lösungsmittel abgeschirmt, während das des Dipeptidbausteins jeweils einen Austausch mit dem Lösungsmittel zeigt. Auffallend ist die Erhöhung der Dispersion der Amidischen Protonen welche von 1.2 auf 1.8 ppm durch das Entschützen der Modellverbindung ansteigt.

geschützten. Die Auftragung der Änderung der chemischen Verschiebung gegen die Temperatur liefert eine Gerade, deren Steigung $\Delta\delta/\Delta T$, also die Temperaturabhängigkeit, wiedergibt. Abbildung 36 zeigt deutlich den linearen Zusammenhang zwischen Temperatur und $\Delta\delta$. Ein Abweichen vom linearen Verhalten würde auf zusätzliche Faktoren hinweisen, welche die Konformation beeinflussen oder die Qualität der Messung in Frage stellen.

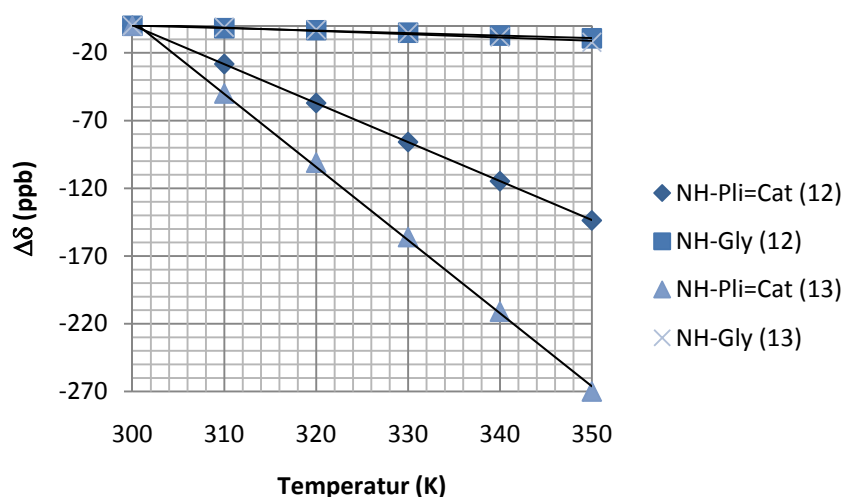


Abbildung 36 Grafische Darstellung der Temperaturgradienten der Verbindungen (12) und (13). Sehr gut zu erkennen ist die lineare Abhängigkeit von der Temperatur.

Die Abschirmung des amidischen Protons des Glycins lässt den Schluss auf eine intermolekulare Wasserstoffbrücke oder auf eine sehr starke konformative Abschirmung des Protons vom Lösungsmittel zu. Wahrscheinlicher in diesem Zusammenhang ist das Vorhandensein einer Wasserstoffbrücke, da das amidische Proton des Dipeptidbausteins eine deutliche Orientierung zum Lösungsmittel zeigt und daher eine globuläre Struktur ausgeschlossen werden kann.

In Abbildung 37 sind die beiden möglichen Extrema der Konformation für ein Zyklopeptid, welches zwei Dipeptidbausteine enthält, schematisch dargestellt. Unter der Annahme, dass das Zyklopeptid als Rechteck vorliegt, so kann der Dipeptidbaustein aufgrund seiner eingeschränkten Flexibilität nur

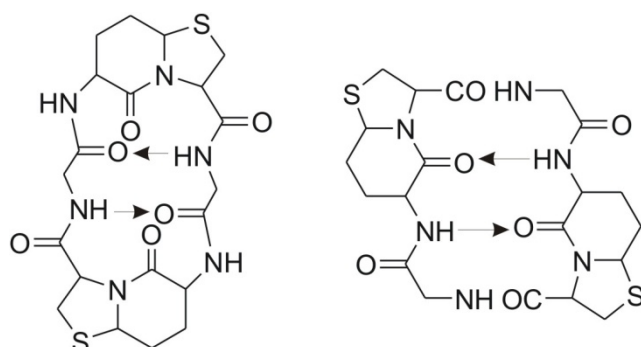


Abbildung 37 Darstellung der zwei grundsätzlich möglichen Konformationen für ein zykliches Hexapeptid. Der Dipeptidbaustein kann wahlweise die $i+1$ und $i+2$ Positionen besetzen (sog. „kurze Seite“, links) oder die Positionen i und $i+1$ (sog. „lange Seite“, rechts).

zwei Positionen einnehmen. Entweder werden die Positionen $i+1$ und $i+2$ besetzt, die sogenannte „kurze Seite“, oder der Dipeptidbaustein belegt die Positionen i und $i+1$ und liegt damit in der „langen Seite“. Je nach Position des Dipeptidbausteins findet sich ein anderes Wasserstoffbrückenmuster für das Zyklopeptid. Ist die lange Seite durch den Dipeptidbaustein besetzt, so ist dessen amidisches Proton wie in Abbildung 37 (rechts) gezeigt in eine Wasserstoffbrücke

eingebunden. Besetzt der Dipeptidbaustein hingegen die kurze Seite, so wird die Aminosäure an der $i+3$ Position in eine Wasserstoffbrücke eingebunden. Die Koordination des amidischen Protons der $i+3$ ten Aminosäure kann dabei gleichermaßen zum Carbonyl des Dipeptidbausteins wie zum Carbonyl der i -ten Aminosäure stattfinden. Im Fall der betrachteten Modellpeptide **(12)** und **(13)** deutet das Muster der Wasserstoffbrücken darauf hin, dass der Dipeptidbaustein die Positionen $i+1$ und $i+2$ besetzt. Dieses Verhalten ist im Zusammenhang mit der Verwendung des Dipeptidbausteins als β -turn Mimetikum sehr wünschenswert, da die Besetzung der kurzen Seite ein β -turn-artiges Strukturmotiv voraussetzt. Gestreckte Dipeptidbausteine hingegen bevorzugen die lange Seite von Zyklopeptiden, wie von Geyer *et al.* mehrfach gezeigt werden konnte.^[59, 82] Die Betrachtung der Kopplungskonstanten von Fünf- und Sechsring des

Dipeptidbausteins zeigen einen deutlichen Unterschied im *Puckering* des Sechsrings (Tabelle 3) beim Vergleich des geschützten mit dem entschützten Pli=Cat der Zyklopeptide. Auch wenn sich das Entfernen des Acetals nur geringfügig auf die Konformation des Zyklopeptids

auswirkt, so ist der Einfluss auf den Sechsring erheblich. Dies ist zunächst einmal sehr erstaunlich, da die Vermutung nahe liegt, dass eine Veränderung der Konformation des Dipeptidmimetikums eine deutliche Auswirkung hinsichtlich der Konformation des Zyklopeptids haben sollte. Im Fall von Pli=Cat allerdings zeigt sich, dass der Dipeptidbaustein in der freien genauso wie in der geschützten Form einen β -turn induziert. Es zeigt sich, dass die Struktur des Bausteins als geschützte Verbindung

Tabelle 3 Gegenüberstellung der Kopplungskonstanten von Fünf- und Sechsring des Dipeptidbausteins in den Modellverbindungen **(12)** und **(13)**.

	(12)	(13)
$^3J_{6H,7H}$ [Hz]	2.1	8.4
$^3J_{7H,8H}$ [Hz]	6.8	2.3
$^3J_{8H,8aH}$ [Hz]	1.9	1.4
$^3J_{2H,3H}$ [Hz]	< 1.0, 6.3	2.2, 6.3

in verschiedenen Kristallstrukturen stets eine Wannen-Konformation einnimmt (Abbildung 25), entschützt allerdings eine *envelope*-Konformation zeigt (Abbildung 38). Beide Konformationen erlauben trotz ihrer unterschiedlichen Bindungswinkel, dass ein U-Motiv gebildet wird. Dieses Verhalten von Pli=Cat war nicht vorhersehbar, ermöglichte es allerdings, dass der Dipeptidbaustein ohne Einschränkungen in der Fmoc-basierten Festphasensynthese eingesetzt werden konnte. Da im Allgemeinen

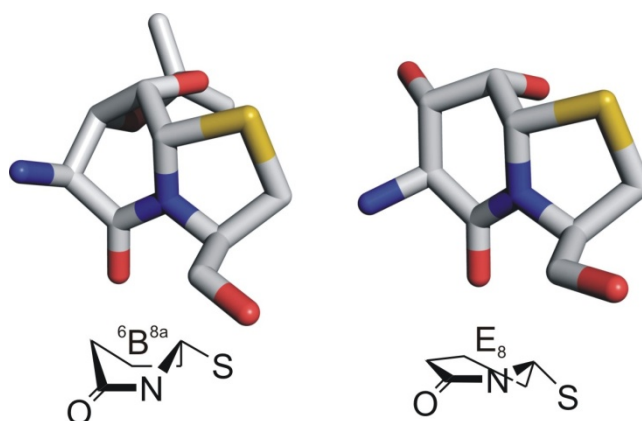


Abbildung 38 Ausschnitte aus Kristallstrukturen, dargestellt ist jeweils ausschließlich der Dipeptidbaustein. Zu erkennen ist die Wannen-Konformation (links) des geschützten sowie die *envelope*-Konformation (rechts) des entschützten Dipeptidbausteins.

säurelabile Seitenkettenschutzgruppen orthogonal zur N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe verwendet werden ist die Abspaltung des Acetals von Pli=Cat unter Standardbedingungen unvermeidlich. Neben den konformativen Änderungen des Sechsrings durch die Entschützung zeigte sich weiterhin, dass eine deutliche Erhöhung der Polarität des entschützten Zyklopeptids vorlag. Während die geschützte Verbindung (**12**) noch durch das Suspendieren in Wasser von Nebenprodukten befreit werden konnte, war die entschützte Verbindung (**13**) wasserlöslich. Diese Polaritätserhöhung ist auf die freien Hydroxylgruppen der Dipeptidbausteine zurückzuführen. Dadurch war es möglich, die Polarität der Modellpeptide gezielt durch das Entschützen zu beeinflussen, ohne einen Einfluss auf die Konformation ausüben zu müssen.

3.2.4 Synthese und Konformationsanalyse des C₁-symmetrischen Zyklopeptids (**17**)

Um weitere Informationen hinsichtlich der konformativen Auswirkung von Pli=Cat zu gewinnen wurde ein weiteres zyklisches, nicht C₂-symmetrisches Modellpeptid der Sequenz zyko(Pli^P=Cat-Gly-Pli^P=Cat-Phe) dargestellt. Zum einen sollte ausgeschlossen werden, dass die ausschließliche Verwendung von Glycin einen Einfluss auf die Konformation des zyklischen Hexapeptid besitzt, zum anderen sollte durch die Symmetrieaufhebung des Zyklopeptids der spektroskopische Informationsgehalt der Verbindung verdoppelt werden.

Die Darstellung des offenkettigen Vorläufers der Verbindung **(17)** erfolgte zum einen erfolgreich an der Festphase, zur Darstellung größerer Mengen wurde jedoch auf die Synthese mittels Fragmentkupplung zurückgegriffen. Die Zyklisierung des offenkettigen Vorläufers wurde entsprechend der Verbindung **(12)** in DMF unter hoher Verdünnung mit DPPA/NaHCO₃ durchgeführt, dabei wurde eine für diese Reaktion sehr gute Ausbeute von 67% nach der chromatographischen Aufreinigung erzielt (Abbildung 39).

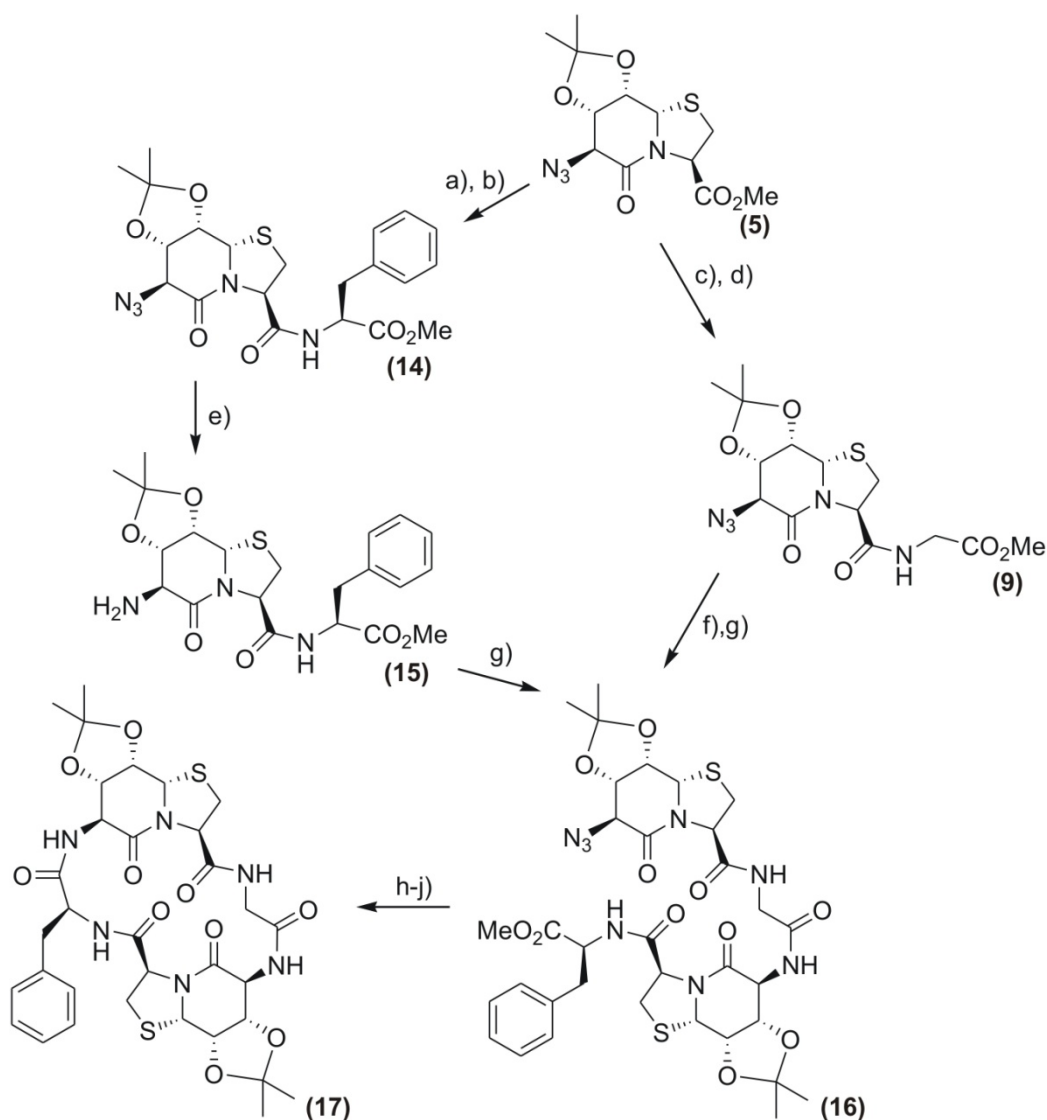


Abbildung 39 Synthese des zyklische Hexapeptids **(17)** ausgehend vom Azid **(5)**. a) Verseifen mit 1N LiOH in 1,4-Dioxan/H₂O, b) Kuppeln mit HBTU/HOBt und Phenylalaninmethylester (47%), c), d) entsprechend a), b) allerdings Kuppelung mit Glycinmethylester (83%), e) Reduzieren mit Pd/C und H₂ (94%), f) Verseifen mit 1N LiOH in 1,4-Dioxan/H₂O g) Kuppeln mit HBTU/HOBt (29%), h) Reduzieren, verseifen (wie bereits beschrieben e), f)), anschließend zyklisieren mit DPPA/NaHCO₃ im DMF ($c = 10^{-3}$ mol/L) (67%).

Die NMR-spektroskopische Untersuchung zeigte, dass die C₁-Symmetrie des Zyklopeptids zusätzliche Informationen hinsichtlich der Konformation erbrachte. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die amidischen Protonen der Aminosäuren jeweils zu beiden Brückenkopfprotonen einen ROE zeigen. Zwar ist der Kontakt zwischen dem Gly-NH und dem 8a-H in Abbildung 40 wegen des recht

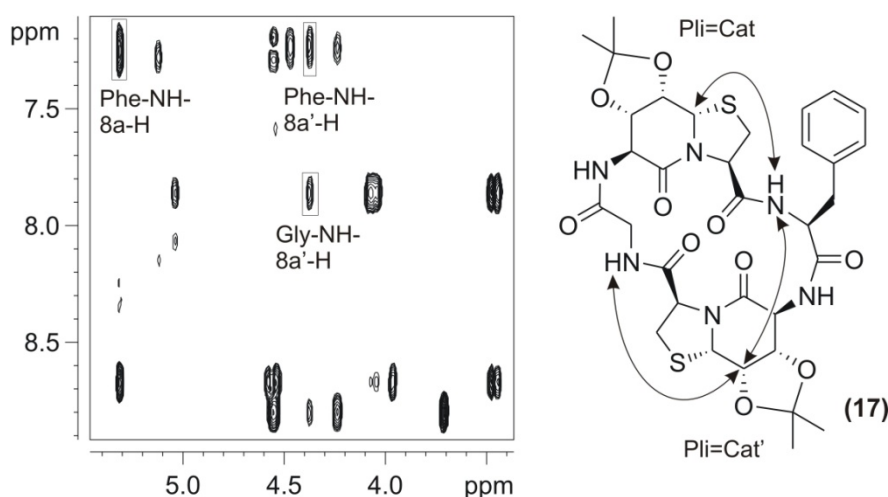


Abbildung 40 ROESY-Spektrum, 600 MHz, DMSO_{d6}. Durch die Aufhebung der C₂-Symmetrie ist es möglich, ROE-Kontakte zu beobachten, welche zuvor nicht identifizierbar waren. Das amidische Proton des Phenylalanins beispielsweise sieht beide Brückenkopfprotonen der Dipeptidbausteine, was dafür spricht, dass die beteiligten Protonen jeweils in das Innere des Zylopeptids weisen. Zur Unterscheidung der beiden Dipeptidbausteine ist der derjenige nach Phenylalanin als Pli=Cat' bezeichnet worden.

schwachen Signals nicht gezeigt, jedoch kann auch dieser unter genauerer Betrachtung der Datensätze identifiziert werden. Da aufgrund der C₂-Symmetrie der Verbindungen **(12)** und **(13)** nicht zwischen den beiden Dipeptidbausteinen unterschieden werden konnte, lieferte die Verbindung **(17)** sehr wertvolle Information hinsichtlich der Ausrichtung der betreffenden Protonen. So lässt sich daraus schließen, dass die Brückenkopfprotonen genauso wie die amidischen Protonen der jeweiligen Aminosäuren zum Inneren des Zylopeptids hin orientiert sind. Zusätzlich wird diese Vermutung durch die Betrachtung der Temperaturgradienten der amidischen Protonen unterstützt. In Tabelle 4 sind die Temperaturgradienten, welche in DMSO zwischen 300 und 350 K bestimmt wurden, aufgelistet. Es zeigt sich zum Einen, dass die amidischen Protonen der Dipeptidbausteine zum Lösungsmittel hin orientiert sind und zum Anderen, dass die übrigen Amide stark vom Lösungsmittel abgeschirmt sind. Entsprechend dem Zylopeptid **(12)** scheint auch im Fall der vorliegende Verbindung ein β -turn vorzuliegen, wodurch gezeigt werden konnte, dass der Wechsel der Aminosäure von Glycin zu Phenylalanin keinen Einfluss auf die Konformation der Modellpeptide besitzt.

Tabelle 4 Gegenüberstellung der Temperaturgradienten der Verbindungen **(17)** (geschützt) und **(18)** (entschützt). Auch in diesem Beispiel zeigt sich deutlich, dass die Entfernung des Acetals keine deutliche Auswirkung auf die Konformation des Hexapeptids besitzt.

	(17) (geschützt)	(18) (entschützt)
	$\Delta\delta$ (ppb/K)	$\Delta\delta$ (ppb/K)
Pli=Cat-NH	-4.46	-4.70
Pli=Cat'-NH	-3.80	-4.22
Gly-NH	-1.06	+0.30
Phe-NH	+1.05	+0.46

3.2.5 Darstellung und Konformationsanalyse eines C₁-symmetrischen zyklischen Hexapeptids mit nur einem Dipeptidbaustein (19)

Um nachzuweisen, dass die strukturbildenden Eigenschaften des Pli=Cat-Bausteins nicht auf kooperative Effekte der Modellpeptide, welche zwei sich gegenüberliegende Dipeptidbausteine enthielten, zurückzuführen war, wurden nachfolgend die zyklischen Modellverbindungen **(19)** und **(20)** dargestellt. Die Synthese des offenkettigen Vorläufers NH₂-Gly-Gly-Pli^P=Cat-Phe-Gly-OH der Verbindung **(19)** erfolgte manuell an der Festphase, die Abspaltung des linearen Peptids wurde mit Dichlormethan/Trifluorethanol/Essigsäure 7:2:1 durchgeführt. Dadurch wurde das Peptid vom 2-Chlorotrityl-Linker abgespalten, die Seitenkettenschutzgruppen blieben jedoch erhalten.^[83] Die Zyklisierung wurde erfolgreich mit DPPA und NaHCO₃ in DMF durchgeführt, nach vollständiger Aufreinigung konnten 31% des Zylopeptids **(19)** erhalten werden. Anteilig wurde die Verbindung **(19)** weiterhin mit TFA/Wasser 95:5 entschützt, so dass der konformative Einfluss der Isopropylidengruppe untersucht werden konnte.

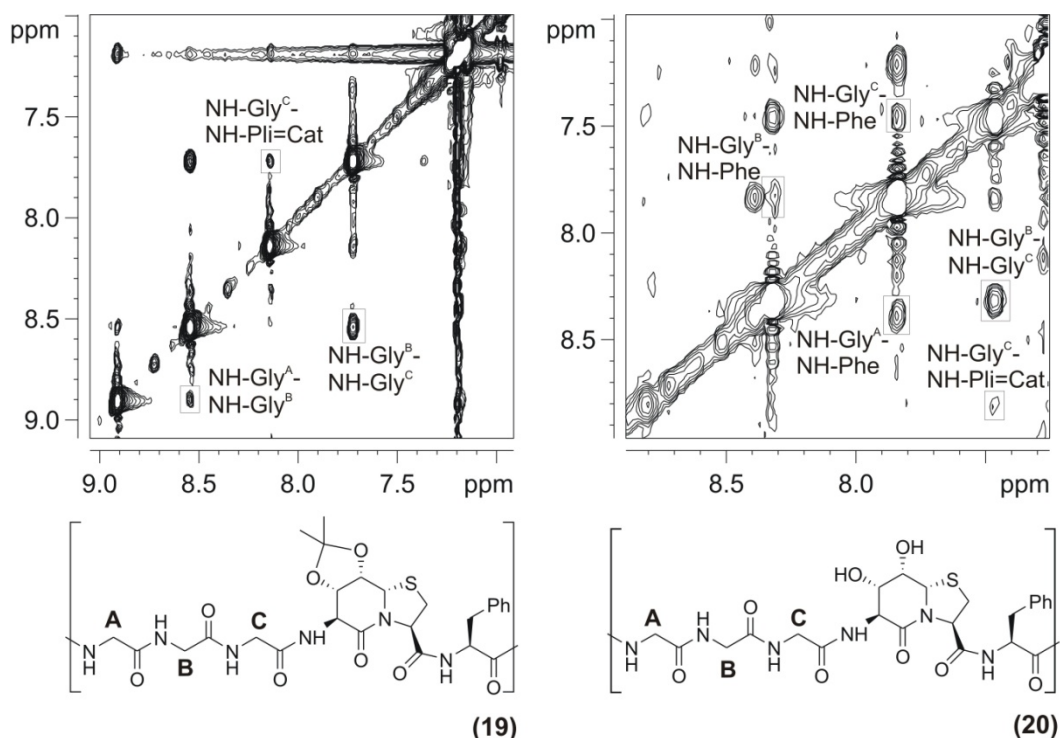


Abbildung 41 ROESY-Spektrum, 500 MHz (links), 600 MHz (rechts), DMSO_{d6}. Dargestellt sind die NH-NH-ROEs der Verbindungen **(19)** und **(20)**. Beide zeigen ein identisches ROE-Muster, scheinbare Unterschiede kommen vor allem durch die fehlende Zuordnung der Phe-NH-Kontakte (links) zustande.

Es zeigte sich, dass das Entschützen der Verbindung **(19)** die Konformation des Zylopeptids kaum beeinflusste. Die in Abbildung 41 dargestellten ROESY-Spektren weisen ein weitestgehend identisches Muster, abgesehen von den veränderten chemischen Verschiebungen, auf. Die Unterschiede der beiden Spektren kommen dadurch zustande, dass im linken **(19)** keine Zuordnung der ROE-Kontakte des amidischen Protons des Phenylalanins möglich war, da dieses unter den

Aromatensignalen der Seitenkette lag und im rechten **(20)** keine Auflösung zwischen den amidischen Protonen von Gly^A und Gly^B hinsichtlich der Diagonalen möglich war.

Die Bestimmung der Temperaturgradienten des geschützten sowie des entschützten Zyklopeptids bestätigten die Annahme, dass beide Peptide eine ähnliche Konformation aufweisen.

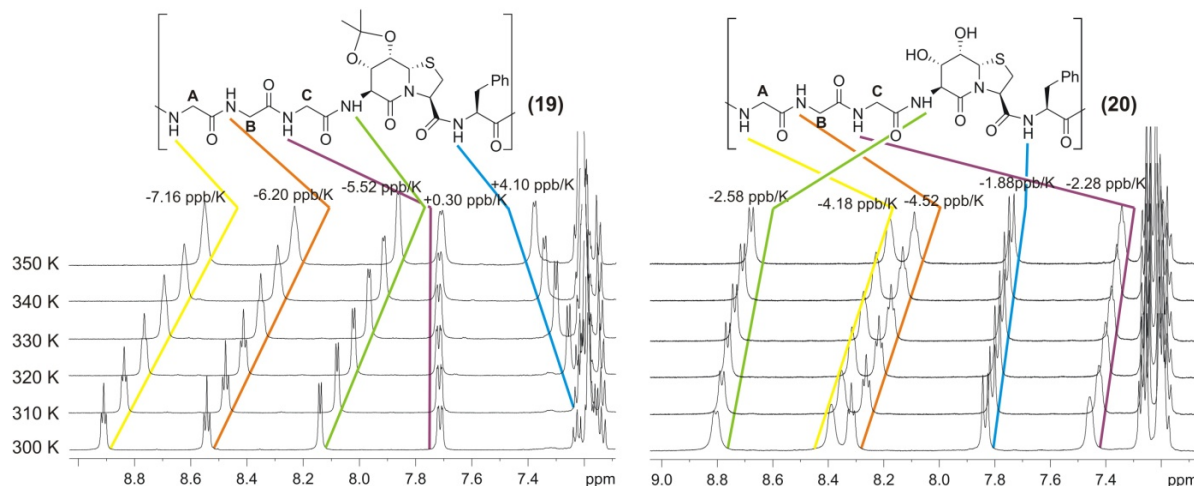


Abbildung 42 ¹H-NMR-Spektrum, 500 MHz (links), 600 MHz (rechts), DMSO_{d6}. Die Zuordnungen der amidischen Protonen sind farblich dargestellt, gut zu erkennen sind die deutliche Abweichung der einzelnen Temperaturgradienten, welche sich zwischen -7.16 ppb/K und +4.10 ppb/K bewegt.

Besonders auffällig ist die Temperaturabhängigkeit des amidischen Protons des Phenylalanins der Verbindung **(19)** (Abbildung 42). Unter normalen Umständen werden ausschließlich negative $\Delta\delta$ beobachtet sofern eine Temperaturerhöhung erfolgt, da ein stärkerer Austausch mit dem Lösungsmittel stattfindet, welcher sich in der Entschirmung des Protons äußert. Die im oberen Beispiel beobachtete Temperaturabhängigkeit liegt jedoch bei +4.10 ppb/K und lässt sich nicht durch die Wechselwirkung des Amids mit dem Lösungsmittel erklären. Vielmehr handelt es sich um einen konformativen Effekt, welcher in diesem speziellen Fall durch den Aromaten des Phenylalanins hervorgerufen wird. Die Analyse der Kopplungskonstanten der β -Protonen des Phenylalanins zeigen für die vicinalen Kopplungen zwischen α - und β -Protonen Werte von $^3J = 5.2$ bzw. 5.8 Hz. Die Betrachtung der *Karplus*-Kurve lässt darauf schließen, dass die Seitenkette zum Inneren des Zyklopeptids hin orientiert ist. Diese Orientierung hat zur Folge, dass es zu einer Wechselwirkung zwischen dem amidischen Proton des Phenylalanins und der eigenen Seitenkette kommt (Abbildung 43). Diese Vermutung wird zusätzlich dadurch bestätigt,

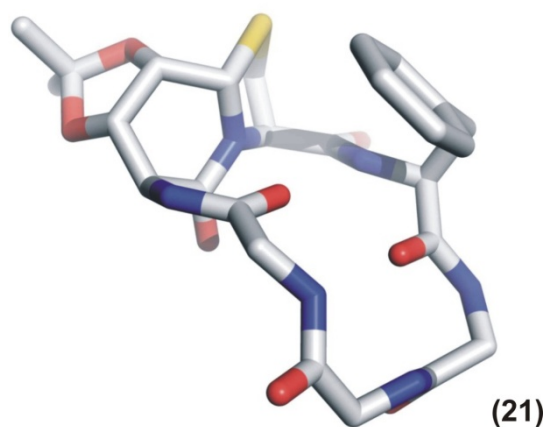


Abbildung 43 Berechnete Struktur von **(19)**, die Orientierung der Phenylalaninseitenkette wurde anhand der Kopplungskonstanten bestimmt. Die Ausrichtung der amidischen Protonen wurde entsprechend der bestimmten Temperaturgradienten und ROE-Kontakte angepasst.

dass unter Temperaturerhöhung eine Vergrößerung der $^3J_{\alpha,\beta}$ -Kopplungskonstanten um etwa ein

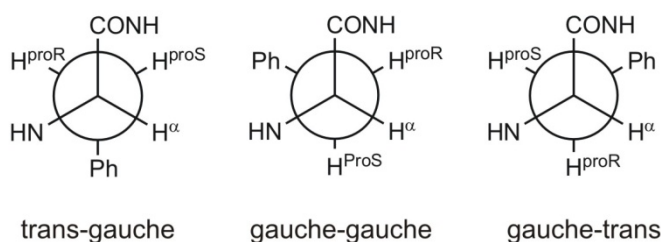


Abbildung 44 Seitenkettenrotamere des Phenylalanins. Die *Newman*-Projektion zeigt die drei Rotamere, zwischen welchen sich das tatsächliche Gleichgewicht bewegt.

Hertz stattfindet. Diese Vergrößerung lässt auf eine Verschiebung des Rotamerengleichgewichts des Phenylalanins schließen. Bei einer maximal möglichen Änderung $\Delta\delta$ der Kopplungskonstante von etwa 10 Hz,^[84] würde die beobachtete Vergrößerung der Kopplungen um ein Hertz einer zusätzlichen Population von

etwa zehn Prozent des *gauche-trans* oder *trans-gauche* Rotamers entsprechen (Abbildung 44).^[32, 85]

Neben dieser phänomenologischen Abweichung eines Temperaturgradienten, deuten die übrigen $\Delta\delta$ der Verbindungen **(19)** und **(20)** auf die Abschirmung der amidischen Protonen vom Lösungsmittel an den i+3ten Positionen der Zyklopeptide hin. Anhand dieses Beispiels konnte sehr schön die weitreichende Auswirkung von Pli=Cat verdeutlicht werden. Durch den Dipeptidbaustein wird die ansonsten sehr dynamische Gly-Gly-Gly-Sequenz in eine Vorzugskonformation verschoben was sich in unterschiedlichen chemischen Verschiebungen sowie Temperaturgradienten der amidischen Protonen äußert (Abbildung 42).

3.2.6 Synthese und Charakterisierung des offenkettigen Peptids (21)

Um den Einfluss der Zyklisierung auf die Eigenschaften des Dipeptidbausteins zu untersuchen, wurde das offenkettige Peptid **(21)** dargestellt. Die Modellverbindung Fmoc-Ala-Pli^P=Cat-Gly-OMe konnte durch zwei einfache Peptidkupplungen in Lösung erhalten werden. Der Dipeptidbaustein wurde auf der Stufe des Azids **(5)** verseift und mit Glycinmethylester gekuppelt, anschließend erfolgte die Reduktion des N-Terminus mit Palladium/Kohle und Wasserstoff gefolgt von der Kupplung mit Fmoc-Alanin. Die Bestimmung der

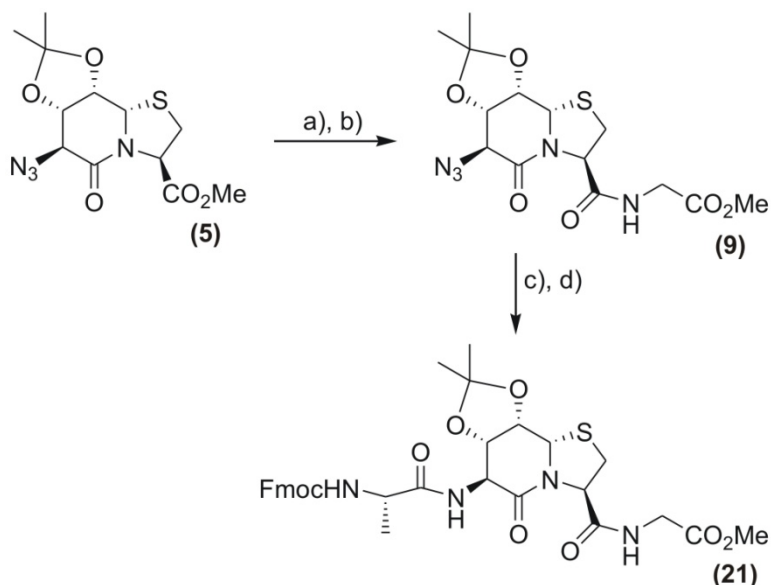


Abbildung 45 Synthese der Modellverbindung **(21)**. a) Verseifen mit 1N LiOH in 1,4-Dioxan/H₂O, b) Kuppeln mit HBTU/HOBt und Glycinmethylester (83%), c) Reduzieren mit Pd/C und H₂, d) Kuppeln mit HBTU/HOBt und Fmoc-Ala-OH (98%).

Temperaturgradienten lieferte die

nachfolgenden Werte: NH-Ala -7.54 ppb/K, NH-Pli^P=Cat -4.94 ppb/K und NH-Gly -3.98 ppb/K. Einzig das $\Delta\delta$ des Glycins deutet auf eine sehr schwache Abschirmung vom Lösungsmittel, die beiden anderen $\Delta\delta$ verweisen deutlich auf eine externe Orientierung der amidischen Protonen. Die

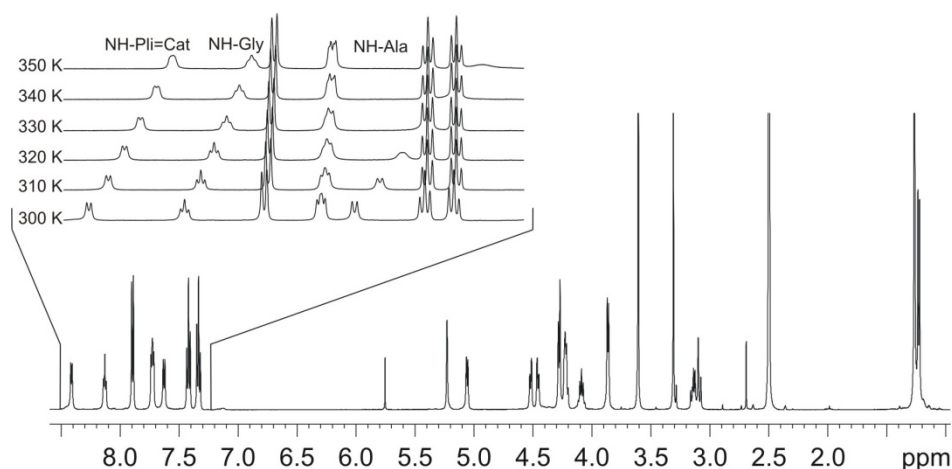


Abbildung 46 ^1H -NMR-Spektrum, 500 MHz, DMSO_{d_6} . Abbildung des vollständigen Spektrums der Verbindung (**21**) sowie eine Spreizung des amidischen Bereichs bei 300 bis 350 K.

Betrachtung des ^1H -NMR-Spektrums der Verbindung (**21**) zeigt eine recht deutliche Aufspaltung der amidischen Protonen von 0.8 ppm, wodurch auf eine Vorzugskonformation des Peptids geschlossen werden kann. In Abbildung 46 ist zum einen das ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung (**21**), zum anderen zusätzlich die Spreizung des amidischen Bereichs bei 300 bis 350 K gezeigt. Es zeigt sich sehr gut die mit der Temperaturerhöhung einhergehende Verbreiterung und starke Hochfeldverschiebung des Alanin-Carbamats was

auf eine deutliche Zunahme der Dynamik der vorliegenden Verbindung schließen lässt.

Zusätzliche Informationen hinsichtlich der vorliegenden Konformation lieferte die Betrachtung des ROESY-Spektrums der Verbindung

(**21**) (Abbildung 47). Der

Kontakt zwischen dem amidischen Proton des Glycins und dem Brückenkopfproton des

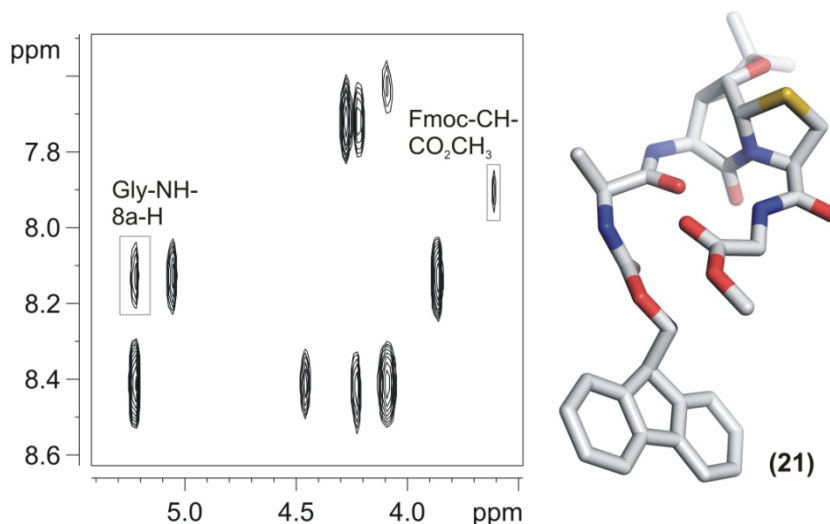


Abbildung 47 Links ROESY-Spektrum, 500 MHz, DMSO_{d_6} . Gezeigt sind die Kontakte innerhalb des NH- α -Bereichs. Hervorgehoben sind die konformativ relevanten ROE-Kontakte, zum einen der Glycin-NH-Brückenkopfproton ROE, welcher die Orientierung des Glycin-Amids andeutet, zum anderen der ROE zwischen den Fmoc-Aromaten und dem Methylester. Rechts ist die auf diesen Daten basierende Modellstruktur dargestellt.

Dipeptidbausteins lässt darauf schließen, dass das Amid wie in Abbildung 47 gezeigt in Richtung des

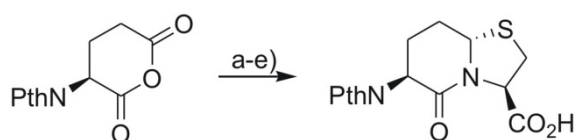
gegenüberliegenden Carbonyls orientiert ist. Weiterhin weist der ROE-Kontakt zwischen dem Methylester des Glycins und einem Aromaten der Fmoc-Schutzgruppe auf eine räumliche Nähe hin. Unter Berücksichtigung der spektroskopischen Daten wurde ein Modell der Verbindung (**21**) erstellt, welches in Abbildung 47 gezeigt ist. Wahrscheinlich ist eine Vororientierung von Alanin und Glycin durch den Dipeptidbaustein. Aufgrund der erhöhten Anzahl von Freiheitsgraden ist jedoch eine sehr viel höhere Dynamik gegeben als bei den zyklischen Derivaten, wodurch der Einfluss von $\text{Pli}^{\text{P}}=\text{Cat}$ im Vergleich zu vorherigen Beispielen vermindert erscheint.

3.3 Bewertung von $\text{Pli}=\text{Cat}$ seitens der Anforderungen an ein β -turn-Mimetikum

Um weitere Informationen hinsichtlich der Qualität von $\text{Pli}=\text{Cat}$ als β -turn Mimetikum zu erlangen, sollte der Dipeptidbaustein in einem direkten Vergleich einem anderen bekannten β -turn Mimetikum gegenüber gestellt werden. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit und der Tatsache, dass das β -turn-dipeptide, kurz Btd, das einzige β -turn Mimetikum war, welches in der Literatur mehrfach Verwendung fand, sollte dieses als Standard herangezogen werden. Unter anderem wurde Btd im Gramacidin S,^[86, 87] in RGD-Peptiden und RCD-Inhibitoren,^[88, 89] sowie in Modellpeptiden^[90] verwendet und untersucht.

Erstmals wurde Btd 1984 von *Nagai* und *Sato* veröffentlicht, die ursprüngliche Synthese beginnt auf der Stufe des Phtalimido-geschützten Glutaminsäureanhydrids, welches im Weiteren über fünf Stufen zum Dipeptidbaustein umgesetzt wird (Abbildung 48). Die Oxidationsreaktion sowie die Kondensation mit Cystein verlaufen nur mit mäßiger Ausbeute, so dass die Gesamtausbeute bei 15% liegt.^[49] Um den Dipeptidbaustein für die

Festphase nutzbar zu machen, muss die Phtalimido-Schutzgruppe mit Hydrazin entfernt



und das freie Btd anschließend mit Boc_2O (bzw. als Fmoc-Dipeptid) geschützt werden, wodurch die Ausbeute nochmals um 28% verringert

Abbildung 48 Synthese des Btd von *Nagai* und *Sato*. a) öffnen des Anhydrids mit PhSH/DCHA , b) Darstellung des Methylesters mit Diazomethan, c) Reduktion mit Raney-Ni, d) Oxidation mit PCC, e) Kondensation mit Cystein.

wird.^[91] Eine alternative und sehr viel elegantere Synthese wurde 1994 von *Bartlet et al.* veröffentlicht.^[90] Aufgrund der schlechten kommerziellen Verfügbarkeit bzw. des hohen Preises von 320 \$ pro Gramm Fmoc-Btd-OH^[92] sollte eine eigene Synthesestrategie erarbeitet werden. Anlehnend an diese Synthese wurde der Zugang zum Btd ausgehend von einem Cbz-geschützten Azalacton, welches über zwei Stufen in >90% zugänglich ist, weiter entwickelt (Abbildung 49).^[93] Vor allem wurde auf die Verwendung giftiger Stannyl-Verbindungen, welche zur Reduktion der Carbonsäurefunktion verwendet wurden, verzichtet. Durch eine Reduktion mit $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$ und anschließender Oxidation mit *Dess-Martin*-Periodinan konnten vergleichbar gute Ergebnisse durch Verwendung nicht toxischer Reagenzien erzielt werden. Weiterhin wurde die Ausbeute der

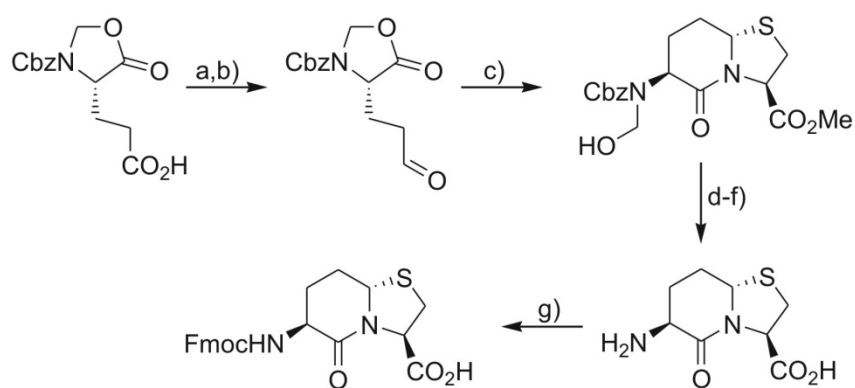


Abbildung 49 Synthese nach *Bartlet et al.* unter den veränderten Bedingungen. a,b) Literatur: Überführen in Säurechlorid, anschl. Reduktion zum Aldehyd mit Bu_3SnH – Veränderung: Reduktion mit $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$ und Oxidation mit DMP. c) Literatur: Kondensation mit L-Cysteinmethylester in reinem Pyridin – Veränderung: Kondensation in MeOH/Pyridin 10:1. d,e,f) Entschützen des Acetals mit Na_2CO_3 , Verseifen des Esters mit LiOH , Entfernen des Cbz-Schutzgruppe mit HBr/HOAc . g) Literatur: Schützen mit Fmoc-OSu in DME – Veränderung: Verwendung von Fmoc-Cl und DIPEA in 1,4-Dioxan.

Kondensation durch die Verwendung von MeOH/Pyridin anstelle von reinem Pyridin verbessert. Zusätzlich wurde die Synthese von *Bartlet* unter Verwendung einer Boc- anstelle der Cbz- Schutzgruppe wiederholt um zu überprüfen, ob dies einen Vorteil hinsichtlich der Ausbeute bzw. eine leichtere Handhabung der

verschiedenen Zwischenprodukte erbringen würde. Jedoch konnten durch den Wechsel der Schutzgruppe weder die Ausbeuten gesteigert noch die Aufreinigung erheblich erleichtert werden.

3.3.1 Darstellung und Konformationsanalyse der Btd-Zyklopeptide (**22**) und (**23**)

Um die Eigenschaften von Pli=Cat hinreichend untersuchen zu können, musste ein Modellpeptid als Templat für den Vergleich mit Btd gewählt werden. Die Synthese von Gramicidin S Derivaten schien in diesem Zusammenhang ungeeignet, da diese aufwendig zu synthetisieren und aufgrund der Aggregation nur schlecht zu handhaben waren. Daher sollte der Vergleich mit Btd durch die Synthese zyklischer Hexapeptide erfolgen. Die Darstellung des offenkettigen Vorläufers des Hexapeptids (**22**) - $\text{NH}_2\text{-Btd-Gly-Btd-Gly-OH}$ – erfolgte mittels automatisierter Festphasensynthese im 0.2 mmolaren Maßstab. Die Zyklisierung durch Umsetzung mit DPPA und NaHCO_3 in DMF lieferte das zyklische Hexapeptid in einer Ausbeute von 31% nach der Aufreinigung.

Ein erster Vergleich der Spektren von (**22**) und (**13**) (Abbildung 50) zeigt deutliche Unterschiede der Temperaturabhängigkeit und Dispersion der beiden Verbindungen. Das $(\text{Btd-Gly})_2$ -Modellpeptid zeigt nur eine äußerst geringe Dispersion von 0.15 ppm im amidischen Bereich, weiterhin ist die Temperaturabhängigkeit der amidischen Protonen des Glycins und des Btd sehr ähnlich. Hingegen zeigt die Modellverbindung (**13**) wie bereits erwähnt eine äußerst hohe Dispersion von 1.80 ppm im Amidbereich und sehr unterschiedliche Temperaturgradienten der amidischen Protonen von Pli=Cat und Glycin. Daraus ließ sich nach Kessler^[38] auf eine dynamische Konformation der Verbindung (**22**) schließen, wahrscheinlich ist hierbei, dass die Konformation des Btd zwischen einer gestreckten und einer $\beta\text{-turn}$ -Struktur hin- und herwechselt (Abbildung 37). Andererseits könnte auch so argumentiert werden, dass Btd eine derart hohe Spannung im Zyklopeptid hervorruft, dass aufgrund der daraus

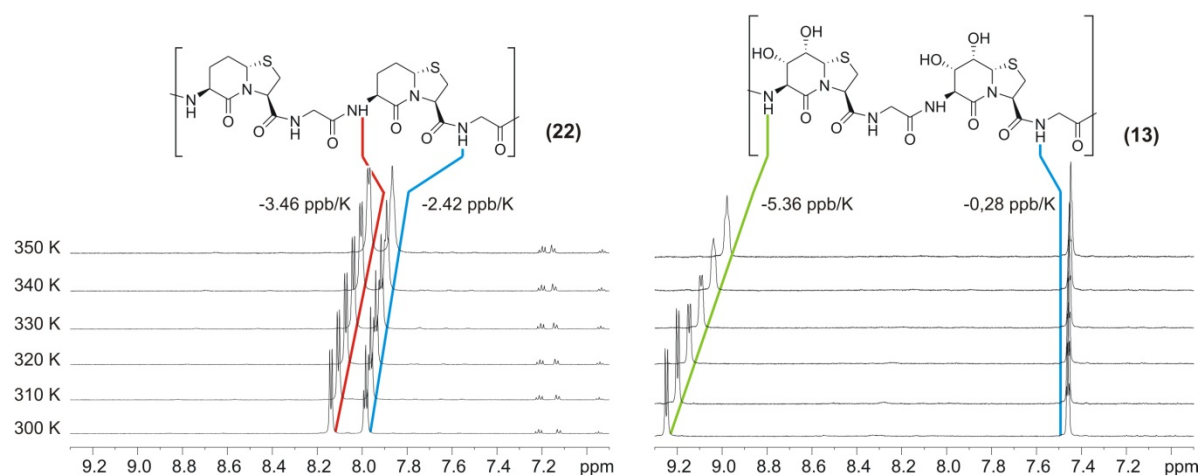


Abbildung 50 ^1H -NMR-Spektrum, 600 MHz, DMSO-d_6 , 300-350K. Gezeigt sind die Temperaturreihen der Verbindungen (22) (links) und (13) (rechts). Gut zu erkennen ist die geringe Dispersion im amidischen Bereich bei Verbindung (22), weiterhin scheinen beide amidischen Protonen hier einen mäßigen Austausch mit dem Lösungsmittel zu zeigen. Im Vergleich dazu zeigt die Verbindung (13) eine sehr hohe Dispersion sowie eine deutliche Abschirmung des amidischen Protons des Glycins.

resultierenden geringen energetischen Unterschiede der Konformationen eine Mittelung bedingt wird. Dass die zweite Annahme nicht zutreffend ist, konnte im Weiteren durch zusätzliche Beispiele belegt werden.

Aufgrund dieser sehr interessanten Ergebnisse sollte der direkte Vergleich von Btd und Pli^P=Cat in einem Hexapeptid durchgeführt werden. Dazu wurde der lineare Vorläufer Verbindung (23) - NH_2 -Pli^P=Cat-Gly-Btd-Gly-OH – ebenfalls mittels automatisierter Festphasensynthese im 0.2 mmolaren Maßstab dargestellt und mit DPPA und NaHCO_3 in DMF zyklisiert wobei die Ausbeute in diesem Fall 29% betrug. Interessant im Bezug auf die Verbindungen (23) und (24) war, welches Dipeptidmimetikum durch seine Eigenschaften die Konformation des zyklischen Hexapeptids dominieren würde. Würde der Einfluss des Btd überwiegen, so sollte die Dynamik des Dipeptidbausteins dazu führen, dass das zyklische Hexapeptid ein Verhalten ähnlich der Verbindung

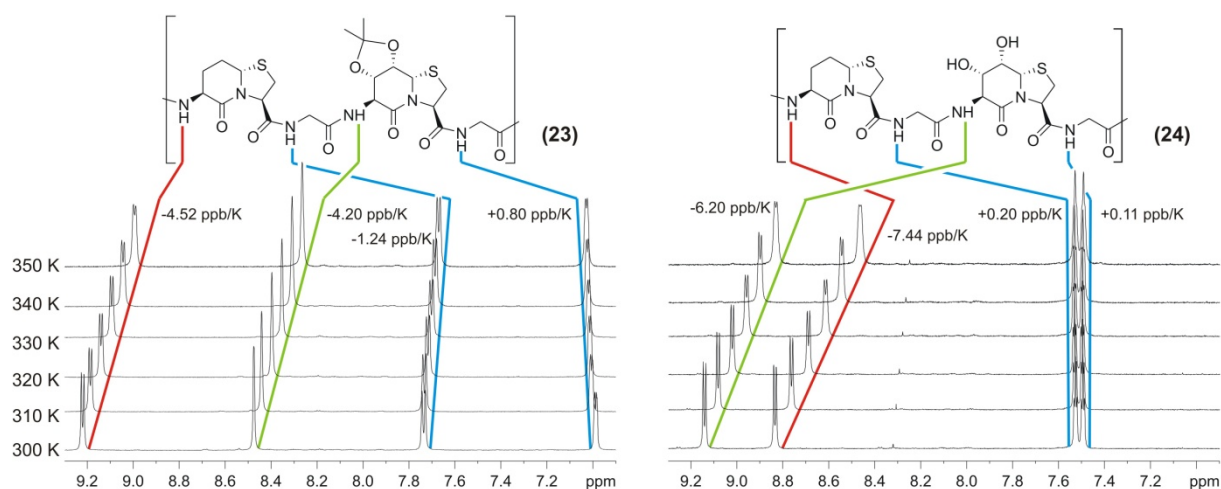


Abbildung 51 ^1H -NMR-Spektrum, 600 MHz, DMSO-d_6 , 300-350K. Gezeigt sind die Temperaturreihen der Verbindungen (23) (links) sowie der entschützten Form des Modellpeptids (24) (rechts). Der konformative Einfluss der Isopropyliden-Schutzgruppe des Pli^P=Cat zeigt sich in diesem Beispiel sehr deutlich.

(22) zeigt. Hingegen würde eine Dominanz von Pli=Cat dazu führen, dass innerhalb des pentazyklischen Peptids auch Btd in die Konformation eines β -turns gezwungen werden sollte.

Wie in Abbildung 51 sehr deutlich zu erkennen ist, trifft zweiteres zu. Die hohe Dispersion im Amidbereich und die stark unterschiedlichen Temperaturgradienten weisen deutlich auf eine einheitliche Konformation hin. Weiterhin zeigt sich, dass die amidischen Protonen des Glycins stark vom Lösungsmittel abgeschirmt sind, während die der Dipeptidbausteine einen eindeutigen Austausch mit dem Lösungsmittel zeigen. Das Entschützen der Verbindung (23) mit TFA/Wasser 95:5 lieferte die Verbindung (24), welche ebenfalls in Abbildung 51 dargestellt ist. Hierbei zeigte sich, dass auch in diesem Fall keine Veränderung der Konformation der Modellpeptide durch das Entfernen des Acetals hervorgerufen wurde. Sehr deutlich wird in diesem Zusammenhang jedoch die Veränderung der chemischen Verschiebung nach dem Entschützen von (23).

Der direkte Vergleich zweier Dipeptidmimetika bzw. die Untersuchung hinsichtlich der gegenseitigen Beeinflussung in einer Modellverbindung ist bis dato nicht bekannt. Umso erstaunlicher sind die vorliegenden Ergebnisse, welche belegen, dass eines der prominentesten β -turn-Mimetika zwar einen Turn besetzen, diesen jedoch selbständig nicht bilden kann. Die Betrachtung der literaturbekannten Beispiele, in denen Btd Verwendung gefunden hat, unter diesem Gesichtspunkt zeigt, dass das Mimetikum stets in einer Umgebung eingesetzt wurde, die einen β -turn vorausgesetzt hat. Mit anderen Worten wurde das Btd wahrscheinlich durch seine Umgebung in die passende Konformation gezwungen. Durch den Vergleich der Dynamik der hier aufgezeigten zyklischen Hexapeptide (Abbildung 52) konnte sehr gut herausgearbeitet

werden, dass die seitens des Btd postulierte Starrheit nicht gegeben ist, sondern dass die Verbindung selbst, zu mindestens im direkten Vergleich zu Pli=Cat eher flexibel ist.

Sehr deutlich wurde in diesen Beispielen erneut gezeigt, dass Pli=Cat in der Lage ist, nicht nur eine β -turn-Konformation einzunehmen, sondern vielmehr die Bildung eines β -turns zu erzwingen. Da der einzige Unterschied zwischen Btd und Pli=Cat im Vorhandensein eines cis-Diols, einer zu allen anderen funktionellen Gruppen eines Peptids komplementären Einheit, besteht, ist wahrscheinlich, dass die

zusätzliche Sterik innerhalb des Sechsrings ein Grund für die

Eigenschaften von Pli=Cat ist. Die auftretende *gauche-gauche*-Wechselwirkung des cis-Diols im Pli=Cat beschränkt die Dynamik des Grundgerüsts, welche im Fall des Btd aufgrund der Methylengruppen gegeben ist.

Der Vergleich der beiden Turn-Mimetika, unabhängig von den vorliegenden Ergebnissen, hinsichtlich ihrer Synthese und Anwendung zeigt einige Unterschiede auf. Ausgehend von der L-Glutaminsäure

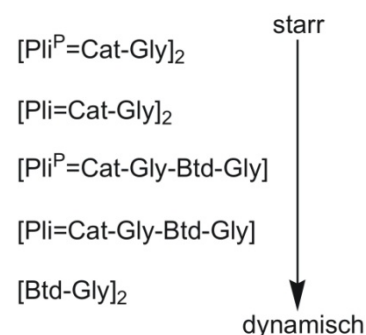


Abbildung 52 Bewertung der verschiedenen zyklischen Hexapeptide seitens der Flexibilität.

beträgt die Ausbeute für Fmoc-Btd-OH 36%, hingegen kann die Verbindung Fmoc-Pli^P=Cat-OH ausgehend von der D-Riburonsäure in einer Ausbeute von 58% dargestellt werden. Auch die Aufreinigung der Zwischenstufen muss seitens des Btd stets chromatographisch erfolgen, während die meisten Stufen des Pli^P=Cat durch Kristallisation aufgereinigt werden können. Seitens der Polarität unterscheiden sich Fmoc-Pli^P=Cat-OH und Fmoc-Btd-OH nur sehr geringfügig, beide Verbindungen sind gut löslich in DMF oder Dichlormethan, allerdings kann durch das Entschützen von Pli^P=Cat zusätzliche Polarität gewonnen werden, was seitens des Btd nicht möglich ist.

Hinsichtlich der Stabilität während der Lagerung und unter den Bedingungen der Synthese sowie der Abspaltung konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Unter Berücksichtigung aller vorliegender Daten liegt der Schluss nahe, dass Pli=Cat hinsichtlich der Anforderungen an Verfügbarkeit, Stabilität und Funktionalität alle Kriterien für ein uneingeschränkt einsetzbares β -turn-Mimetikum erfüllt und das literaturbekannte Btd bei weitem übertrifft.

3.4 Synthese des Übergangszustands-Analogons (27)

Durch den O-/N-Austausch der Hydroxylgruppe an C6 war es möglich den Dipeptidbaustein Pli=Cat darzustellen. Eine interessante Fragestellung war, ob es möglich sei, eine Stickstofffunktionalität an C8 einzuführen. Auch diese Substitution würde zu einem Dipeptidbaustein führen, allerdings würde

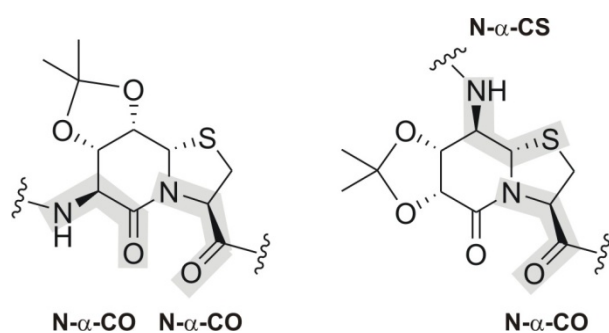


Abbildung 53 Links: Darstellung von Pli=Cat und die Hervorhebung des Verlaufs des Peptidrückgrats. Rechts: Darstellung eines Dipeptids, bei dem das Peptidrückgrat über das C8 verläuft.

das Peptidrückgrat hier über das C8 hinweg verlaufen (Abbildung 53).

Allerdings läge statt des Carbonyls ein Thioether vor, welcher anstelle eines sp²- einen sp³-Kohlenstoffs aufweisen würde. Aufgrund der konformativen Einschränkung des Schwefels im Thiazolidin sollte jedoch eine ähnliche Rigidität, entsprechend einer amidischen Bindung gegeben sein. Da weiterhin die Stufe der Umacetalisierung eingespart werden

konnte, erschien der Versuch der Synthese als sehr lohnenswert. Erste Versuche, die 8-OH unter identischen Bedingungen wie an C6 als Triflat zu aktivieren schlugen fehl. Auch über einen langen Zeitraum konnte kein Umsatz mit Trifluormethansulfonsäureanhydrid beobachtet werden. Diese kann durch die sterische Hinderung des C8 erklärt werden, im Vergleich zur 6-OH wird die C8 Position zusätzlich durch den Fünfring des Thiazolidinlactams abgeschirmt. Wahrscheinlich ist ebenfalls, dass die 6-OH aufgrund des benachbarten Carbonyls elektronenärmer und damit nukleophiler als die 8-OH ist, was ebenfalls die verminderte Reaktivität am C8 erklärt. Die Darstellung von (25) gelang letztlich durch die Zugabe von DMAP, welches eine bessere Aktivierung des Anhydrids hervorrufen

Im Hinblick auf die Konfiguration des C8 vor und nach dem O-/N-Austausch wurden die Verbindungen NMR-spektroskopisch vermessen. Dabei zeigte sich, dass es auch bei der Verbindung **(26)** zu einer vollständigen Inversion von C8 während der Einführung des Azids kommt. Durch die Veränderung der 3J -Kopplungskonstanten des 8-H zum Brückenkopfproton sowie zum 7-H lässt sich die Inversion gut nachvollziehen (Abbildung 56). Während die Aktivierung als Triflat keinen

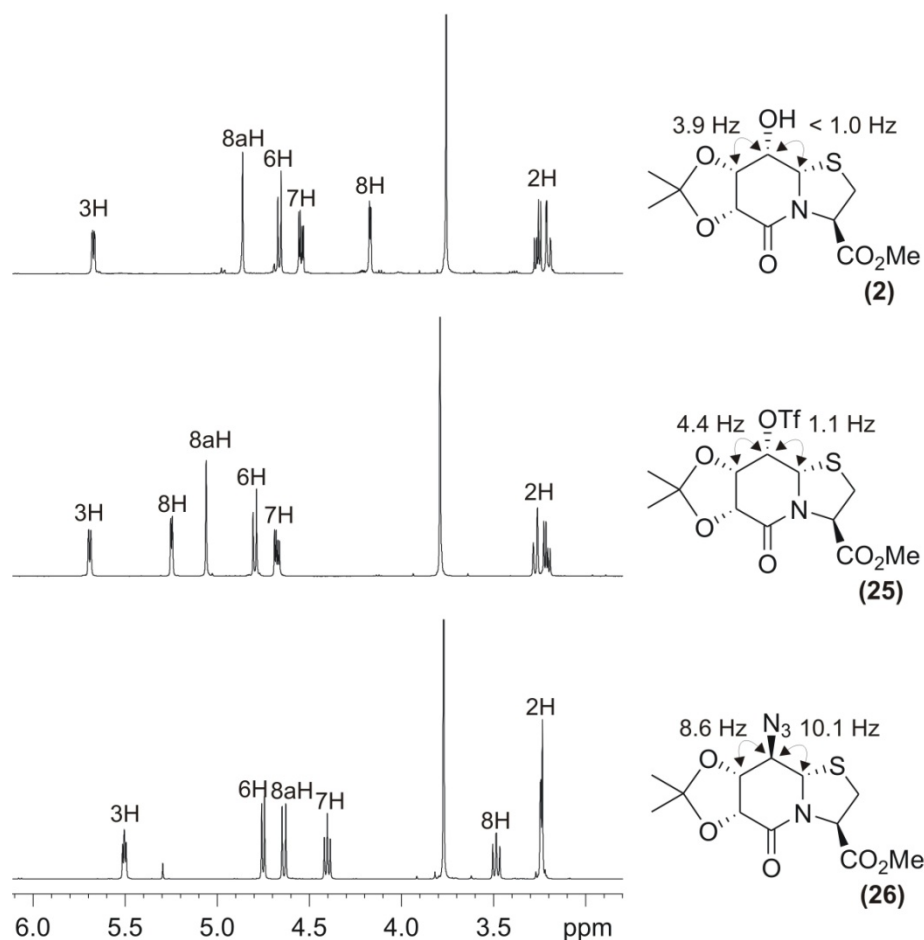


Abbildung 56 ^1H -NMR-Spektrum, 600 MHz, CDCl_3 . Von oben nach unten: Verbindung **(2)**, **(25)** und **(26)**. Der spektroskopische Nachweis für die Inversion des Stereozentrums, an dem die nukleophile Substitution durchgeführt wurde, findet sich in den Kopplungskonstanten des 8-H zu den Kopplungspartnern. Die deutliche Aufweitung der 3J -Kopplung zwischen 8-H und 8a-H zeigt die Inversion sehr deutlich an.

deutlichen Einfluss zeigt, $^3J_{8\text{H},8\text{aH}} < 1.0 \text{ Hz} \rightarrow 1.1 \text{ Hz}$ und $^3J_{8\text{H},7\text{H}} = 3.9 \text{ Hz} \rightarrow 4.4 \text{ Hz}$, verändern sich die Kopplungen nach der Einführung des Azids erheblich. Die $^3J_{8\text{H},7\text{H}}$ -Kopplungskonstante steigt von 4.4 auf 8.6 Hz, noch deutlicher wird die Veränderung zwischen dem 8-H und dem Proton des Brückenkopfs, hier steigt die $^3J_{8\text{H},8\text{aH}}$ -Kopplungskonstante von 1.1 auf 10.1 Hz. Die Betrachtung der Kopplung zwischen dem 6- und 7-H zeigt, dass die extreme Veränderung der Kopplungskonstanten nicht auf eine generelle Konformationsänderung des Sechsrings zurückzuführen ist. Die $^3J_{6\text{H},7\text{H}}$ -Kopplungskonstante beträgt $8.4 \text{ Hz} \pm 0.7 \text{ Hz}$ und unterliegt damit nur sehr geringen Schwankungen und deutet nicht auf eine starke Änderung der Gesamtkonformation.

Zuletzt erfolgte die Reduktion des Azids mit Palladium/Kohle und Wasserstoff, hierfür wurde das Azid in Gegenwart von 10 Gewichtsprozent Katalysator unter einer Wasserstoffatmosphäre von zehn bar für 60 Stunden gerührt. Erstaunlicherweise wurde ein Produktgemisch bestehend aus zwei verschiedenen Fraktionen erhalten, zum einen dem gewünschten Produkt, zum anderen dem hydrolysierten Methylester des Amins. Da die Reduktion in Methanol durchgeführt worden war, war die Hydrolyse des Esters insofern sehr erstaunlich. Aufgrund dieser Nebenreaktion konnten letztlich nur 63% der Verbindung **(27)** isoliert werden.

Bereits hier zeigte sich, dass die Synthese eines Dipeptidbausteins über das C8 keine Möglichkeit zur Verbesserung der Ausbeute liefern konnte. Die drei Stufen bis zur Darstellung des Amins **(27)** lieferten eine Ausbeute von gerade einmal 40%, dem gegenüber stand eine Ausbeute von 82% über vier Stufen bis zur vergleichbaren Vorstufe von $\text{Pli}^{\text{P}}=\text{Cat}$. Trotzdem sollte auch dieser neue Dipeptidbaustein, welcher im folgenden als $\text{Pli}^{8\text{P}}=\text{Cat}$, mit dem zusätzlichen Index 8 für C8, bezeichnet werden soll, auf seine Auswirkung hinsichtlich der Konformation im Peptidrückgrat untersucht werden.

3.4.1 Versuch zur Darstellung eines $[\text{Pli}^{8\text{P}}=\text{Cat-Gly}]_2$ Zyklopeptids

Die Synthese des offenkettigen Hexapeptids **(32)** erfolgte mittels Fragmentkupplung in Lösung, ähnlich der Darstellung der vorherigen Hexapeptide (Abbildung 57).

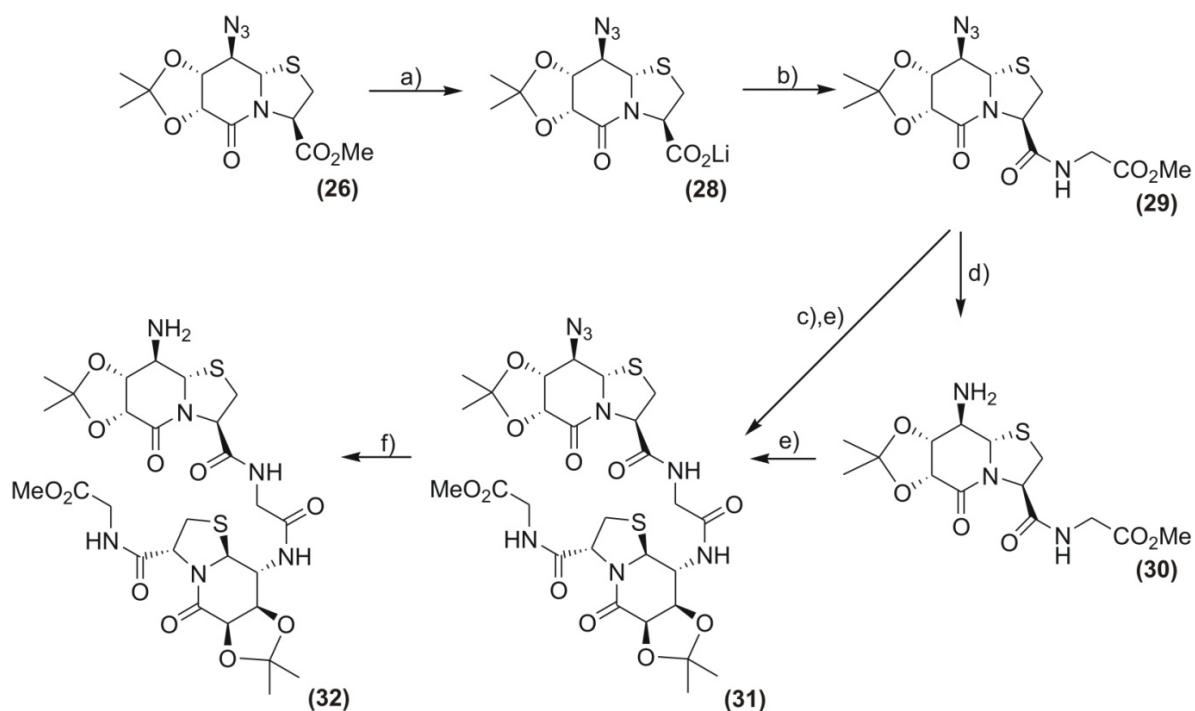


Abbildung 57 Synthese des offenkettigen Hexapeptids **(32)**. a) Verseifen mit 1N LiOH in 1,4-Dioxan/ H_2O , b) Kuppeln mit HBTU/HOBt und Glycinmethylester (67%), c) Verseifen mit 1N LiOH in 1,4-Dioxan/ H_2O , d) Reduzieren mit Pd/C und H_2 (36%), e) Kuppeln mit HBTU/HOBt (88%), f) Reduzieren mit Pd/C und H_2 (79%).

Ausgehend vom Azid **(26)** erfolgte die Verseifung mit LiOH in einer Mischung aus 1,4-Dioxan und Wasser **(28)**. Anschließend erfolgte die Kupplung mit Glycinmethylester und HBTU/HOBt sowie DIPEA

als Base zum Tripeptid (**29**). Dieses wurde anteilig unter den bereits zuvor erwähnten Bedingungen verseift bzw. mit Palladium/Kohle und Wasserstoff zum Amin (**30**) reduziert. Durch die Kupplung der beiden so erhaltenen Tripeptidfragmente entsprechend der vorherigen Kupplung mit Glycinmethylester wurde das offenkettige Hexapeptid (**31**) erhalten. Die Aufreinigung des Hexapeptids gestaltete sich als sehr umständlich, da die Löslichkeit in den gängigen Lösungsmitteln wie Methanol, Essigsäureethylester oder Dichlormethan äußerst gering war. Daher war eine chromatographische Aufreinigung hier nicht möglich, letztlich konnte das Peptid durch Suspendieren unter Ultraschall in Methanol von allen störenden Verunreinigungen befreit werden. Im letzten Schritt wurde das Azid mit Palladium/Kohle und Wasserstoff reduziert, hierfür musste die Verbindung (**31**) in einer relativ großen Mengen Methanol/Dichlormethan aufgrund der niedrigen Löslichkeit aufgelöst werden. Nach chromatographischer Aufreinigung konnte das Amin (**32**) mit einer Ausbeute von 49% erhalten werden.

Zuletzt wurde der Methylester der Verbindung (**32**) wie bereits zuvor beschrieben mit LiOH in 1,4-Dioxan/Wasser verseift. Das so vollständig entschützte Hexapeptid wurde unter hoher Verdünnung in DMF gelöst und bei 3 °C mit DPPA und NaHCO₃ zur Zyklisierung umgesetzt (Abbildung 58). Die Verfolgung der Reaktion mittels RP-HPLC zeigte den vollständigen Verbrauch des Edukts nach vier Tagen an. Die Analyse des Rohprodukts zeigte, dass eine Vielzahl von Verbindungen

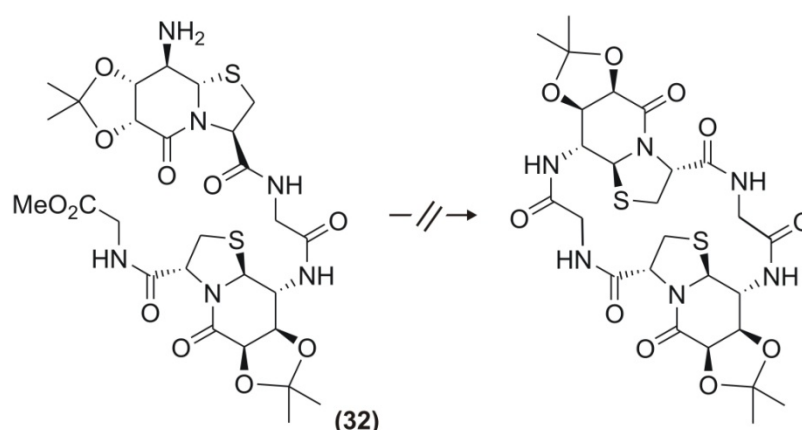


Abbildung 58 Versuch der Zyklisierung der Verbindung (**32**). Als erstes erfolgte die Verseifung des Methylesters, anschließend sollte in DMF mit DPPA/NaHCO₃ zyklisiert werden.

entstanden war, wobei keine als das gewünschte zyklische Hexapeptid identifiziert werden konnte. Allerdings zeigte sich in der LC-MS, dass anstelle des Hexapeptids ein zyklisches Dodecapeptid entstanden war, dass also entgegen der gewünschten Zyklisierung zuerst eine Dimerisierung mit nachfolgendem Ringschluss stattgefunden hatte. Der Versuch der Aufreinigung der Produktmischung zum Erhalt einer sauberen Produktfraktion des Dodecapeptids war jedoch auch mittels präparativer RP-HPLC nicht möglich. In diesem Zusammenhang ist fraglich, warum die Zyklisierung so außerordentlich schlecht verlaufen ist. Da die Umsetzung unter mehrfach erprobten Bedingungen

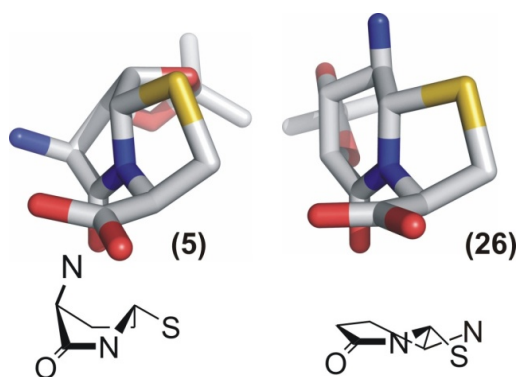


Abbildung 59 Links: Ausschnitt aus der Kristallstruktur (5), rechts: anhand von Kopplungskonstanten berechnete Struktur der Verbindung (26).

stattfind, ist nicht davon auszugehen, dass hier der Grund für das Scheitern der Reaktion lag. Wahrscheinlicher ist die Annahme, dass die Konformation von $\text{Pli}^{\text{BP}}=\text{Cat}$ nicht die Voraussetzungen erfüllt hat, welche für die Zyklisierung notwendig gewesen wären. Entscheidend scheint in diesem Fall daher die Frage nach einer gebogenen oder gestreckten Konformation, auch wenn grundsätzlich beide Konformationen in ein zyklisches Hexapeptid integrierbar sein sollten. Die Betrachtung der berechneten Struktur in Abbildung 59 und der

Vergleich dieser, mit der bereits bekannten Struktur des Dipeptidbausteins $\text{Pli}=\text{Cat}$, zeigt, dass $\text{Pli}^{\text{BP}}=\text{Cat}$ beinahe in einem perfekten rechten Winkel vorzuliegen scheint, während $\text{Pli}=\text{Cat}$ eine deutliche *Turn*-Konformation aufweist. Grundsätzlich sollte $\text{Pli}^{\text{BP}}=\text{Cat}$ daher sehr gut die lange Seite eines zyklischen Hexapeptids besetzen können, warum auch dies letztlich nicht möglich war, konnte leider nicht aufgeklärt werden. Vermutlich sind konformative Einschränkungen des hexazyklischen Peptids (32) für das Scheitern der Zyklisierungsreaktion verantwortlich.

3.5 Darstellung und Charakterisierung der Substanzklasse der 6,5-bizyklischen Oxazolidinlactame (33)

Eine interessante Fragestellung umfasste das Thema der Kondensation des auf D-Ribose basierenden Uronsäurederivats mit Serinmethylester anstelle von Cysteinmethylester. Das dadurch entstehende Oxazolidinlactam sollte eine weit höhere Stabilität gegenüber oxidierenden Bedingungen besitzen, da die Oxidation des Schwefels zum Sulfon nicht mehr möglich wäre. Weiterhin war fraglich, wie sich die verkürzte O-C-Bindung auf die Konformation des Dipeptidbausteins auswirken würde.

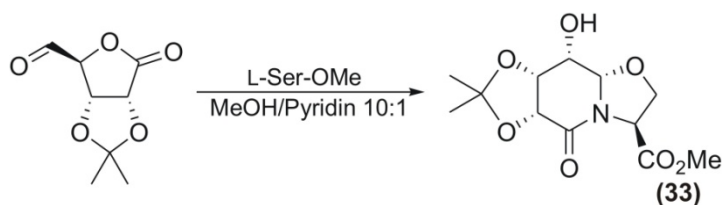


Abbildung 60 Umsetzung mit Serinmethylester zum 6,5-bizyklischen Oxazolidinlactam (33). Im Vergleich zur Kondensation mit Cystein kann das Oxazolidinlactam nur mit einer Ausbeute von 19% isoliert werden.

Zur Klärung dieser Fragestellung wurde entsprechend der Umsetzung mit Cystein das isopropylidengeschützte D-Ribonolacton in Acetonitril mit IBX oxidiert. Da bei der Kondensation mit Serin nicht die Gefahr der Oxidation bestand, wie sie in Form der

Cystinbildung bei Cystein auftrat, konnte auf den Ausschluss von Luftsauerstoff verzichtet werden. Die Ausbeuten, welche bei der Kondensation mit Cystein erzielt wurden, konnten bei der Oxazolidinlactam-Bildung mit 19% allerdings nicht erreicht werden (Abbildung 60). In Analogie zu

dem bereits als $\text{Pli}^{\text{P}}=\text{Cat}$ bzw. $\text{Pli}=\text{Cat}$ definierten Thiazolidinlactam wurde dieser neue Baustein mit $\text{Pli}^{\text{P}}=\text{Cat}^{\text{O}}$ sowie entschützt als $\text{Pli}=\text{Cat}^{\text{O}}$ bezeichnet, wobei der Index O für das Oxazolidinlactam steht. Interessant hierbei war die Frage nach der mechanistischen Bildung des Lactams (**33**). Grundsätzlich sind zwei mögliche Reaktionspfade denkbar (Abbildung 61). Zum einen besteht die Möglichkeit der Oxazolidin-Bildung welcher sich die Acylierung des Oxazolidin-Stickstoffs durch Öffnung des Lactons anschließt. Zum anderen ist die Bildung über ein *N*-Acyliminium denkbar,^[55] dies würde allerdings eine 5-endo-trig-Zyklisierung voraussetzen, welche nach den *Baldwin*-Regeln streng genommen verboten wäre.^[95-98] Nach dem von *Geyer et al.* postulierten Mechanismus für die Bildung des

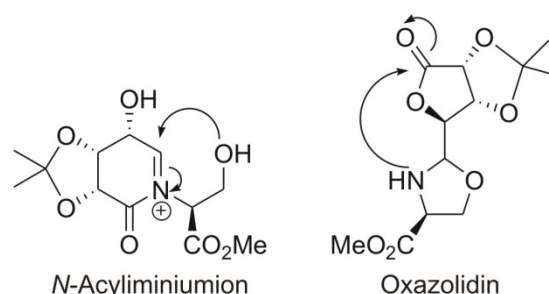


Abbildung 61 Mögliche Bildungswege des Oxazolidinlactams. Rechts: Über ein Oxazolidin und anschließende Acylierung des Oxazolidin-Stickstoffs. Links: Über ein *N*-Acyliminium (5-endo-trig).

Thiozolidinlactams über einen 5-endo-trig-Ringschluss ist es fraglich, ob die von *Baldwin* aufgestellten Regeln im Fall des Oxazolidinderivats ihre Gültigkeit besitzen. Dadurch wäre die Bildung des Lactams zwar möglich, ebenso aber könnten die niedrigen Ausbeuten erklärt werden. Die Umsetzungen bis zum Fmoc-geschützten Aminosäurebaustein wurden in vollständiger Analogie zum Thiazolidinlactam durchgeführt und sollen an dieser Stelle nur kurz aufgeführt werden. Die

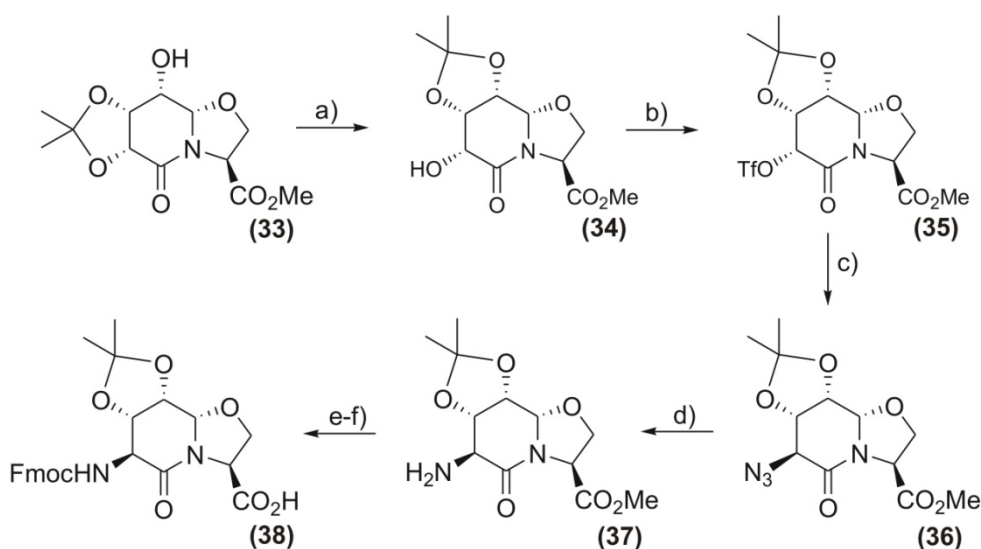


Abbildung 62 Syntheschema des Fmoc-geschützten Oxazolidin-Dipeptidbausteins (**33**). a) TFA/DCM (99%), b) TF_2O , Pyridin (76%), c) NaN_3 , DMF (99%), d) Pd/C, H_2 (84%), e) LiOH, 1,4-Dioxan/ H_2O , f) Fmoc-OSu, DIPEA (93% für e) und f)).

Umacetalisierung zur Verbindung (**34**) gelang in Dichlormethan/Trifluoressigsäure innerhalb von einer Stunde, was etwa einem Drittel der Dauer der Umacetalisierung des Schwefelanalogs (**3**) entspricht. Auffällig seitens der Synthese war, dass die Bildung von Nebenprodukten während der Aktivierung mit Trifluormethansulfonsäureanhydrid zu (**35**) geringer ausfiel als bei der Aktivierung

des Thiazolidinderivats. Weiterhin wurde das Azid (**36**) ausschließlich als Öl erhalten, dies ist insofern erstaunlich, da das Azid des Thiazolidinderivats besonders gut auskristallisierte. Die Reduktion von (**36**) ergab das Amin (**37**), welches in guten Ausbeuten (93%) zum Fmoc-Dipeptidbaustein (**38**) umgesetzt werden konnte. Ein deutlicher Unterschied zwischen Oxa- und Thiazolidinlactam zeigte sich in der NMR-spektroskopischen Betrachtung der verschiedenen Derivate.

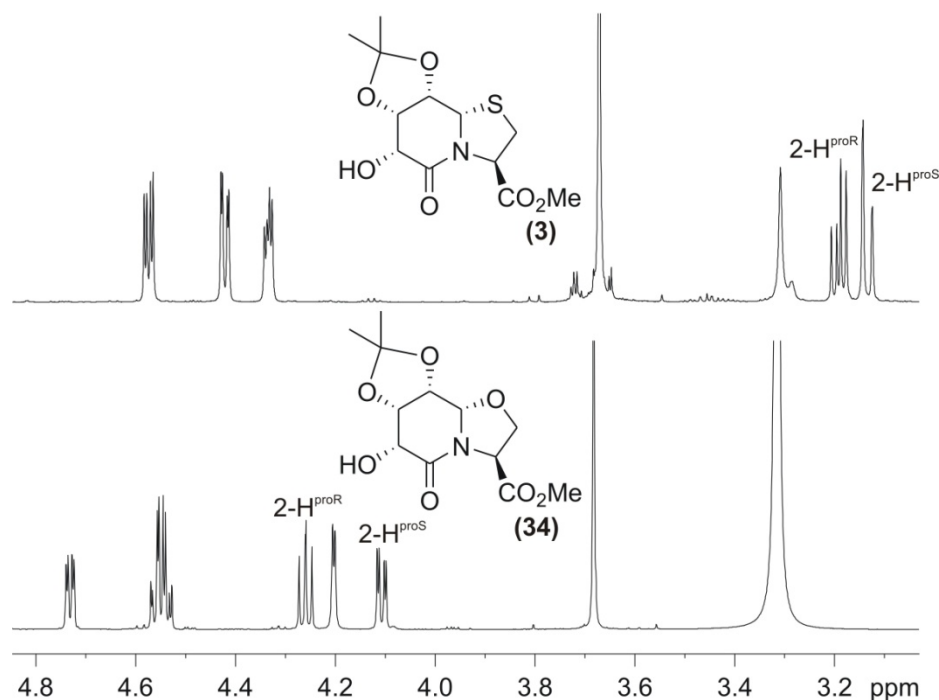


Abbildung 63 ^1H -NMR-Spektrum, 600 MHz, DMSO-d_6 . Vergleich der Verbindungen (**3**) und (**34**). Gut zu erkennen ist der Unterschied der diastereotopen Methylengruppen. Im Fall des Oxazolidinlactams (unten) ist diese durch die Nähe zum Sauerstoff sehr viel stärker entschirmt und daher im ^1H -NMR-Spektrum weiter ins Tieffeld verschoben.

Die diastereotope Methylengruppe des Fünfrings ist in den Oxazolidinderivaten sehr viel stärker ins Tieffeld verschoben (Abbildung 63), weiterhin sind die geminalen Kopplungen um etwa 3 Hz kleiner als in den Thiazolidinderivaten (Tabelle 5). Beides kann durch die höhere Elektronegativität des

Tabelle 5 Auflistung der Kopplungskonstanten verschiedener Oxazolidinderivate. Die Kopplungskonstanten der entsprechenden Thiazolidinlactame sind in Klammern angefügt.

Verbindung	$^3J_{2\text{-H}^R,3\text{-H}}$ [Hz]	$^3J_{2\text{-H}^S,3\text{-H}}$ [Hz]	$^2J_{2\text{-H},2\text{-H}}$ [Hz]	$^3J_{6\text{-H},7\text{-H}}$ [Hz]	$^3J_{7\text{-H},8\text{-H}}$ [Hz]	$^3J_{8\text{-H},8a\text{-H}}$ [Hz]
8-OH (33)	7.3 (6.1)	5.2 (1.9)	8.4 (11.1)	8.6 (8.7)	3.1 (3.9)	2.1 (<2.0)
6-OH (34)	7.2 (6.6)	2.5 (1.3)	8.4 (11.3)	3.0 (3.2)	7.7 (7.6)	1.9 (2.1)
6-OTf (35)	7.0 (6.6)	2.3 (1.3)	8.4 (11.3)	3.6 (3.6)	7.7 (7.6)	2.1 (2.0)
6-N₃ (36)	7.0 (5.7)	3.1 (1.1)	8.5 (11.1)	2.2 (2.3)	7.1 (7.2)	2.2 (2.0)

Sauerstoffs im Oxazolidin begründet werden. Zum einen resultiert daraus direkt eine stärkere Entschirmung der benachbarten Protonen, zum anderen bedingt die höhere Elektronegativität eine Verkürzung der O-C-Bindungen, welche sich in der Veränderung des Fünfring-Puckerings zeigt. Ein

Einfluss auf die Konfiguration des Sechsrings ist hingegen kaum feststellbar. Zwar zeigt auch hier das Brückenkopfproton eine leichte Tieffeldverschiebung von etwa 0.2 ppm, die Kopplungskonstanten innerhalb des Sechsrings sind aber fast identisch mit denen des vergleichbaren Thiazolidin-Derivats (Tabelle 5).

3.5.1 Verwendung von $\text{Pli}^{\text{P}}=\text{Cat}^{\text{O}}$ in den zyklischen Hexapeptiden (45) und (46)

Zur weiteren Analyse des Oxazolidinlactams sollte auch dieses in ein Modellpeptid eingebaut werden, um den Einfluss auf die Konfiguration hin zu untersuchen. Die Überlegung war hierbei, neben dem denkbar einfachsten, C_2 -symmetrischen zyklischen Hexapeptid $(\text{Pli}^{\text{P}}=\text{Cat}^{\text{O}}-\text{Gly})_2$ auch das Thiazolidin- dem Oxazolidinlactam gegenüber zu stellen, um einen direkten Vergleich der beiden Verbindungen in einem Modellpeptid zu ermöglichen. Eine erste Synthese der beiden genannten Modellverbindungen gelang ausgehend vom Fmoc-geschützten Dipeptidbaustein (38) an der Festphase. Auch die Zyklisierung mit DPPA und NaHCO_3 in DMF war möglich, allerdings zeigten sich bei der Aufreinigung erhebliche Schwierigkeiten. Während das Peptid $(\text{Pli}^{\text{P}}=\text{Cat}^{\text{O}}-\text{Gly})_2$ durch Waschen mit Wasser von störenden Verunreinigungen befreit werden konnte, war dies bei den Oxazolidin-Derivaten nicht möglich. Diese zeigten ein sehr viel höhere Polarität, waren in Wasser löslich und auch die chromatographische Aufreinigung war erschwert. Daher mussten die beiden Verbindungen (45) und (46) nochmals in größerem Maßstab über Fragmentkupplung in Lösung dargestellt werden, erst dadurch war es möglich, diese so weit aufzureinigen, dass alle störenden Verunreinigungen entfernt werden konnten. Die Synthese (Abbildung 64) wurde entsprechend des vorherigen Thiazolidinderivats (12) durchgeführt. Beginnend mit dem Azid (36) wurde dieses verseift und mit Glycinmethylester unter Standardbedingungen mit HBTU/HOBt und DIPEA zum Tripeptid (39) gekuppelt. Dieses wurde anteilig mit Palladium/Kohle und Wasserstoff zum Amin (40) reduziert bzw. mit LiOH in 1,4-Dioxan/Wasser verseift. Das Amin (40) wurde nun entweder mit dem zuvor verseiften Tripeptid (39) oder mit der verseiften Verbindung (9), dem Thiazolidin-Analogon, zum jeweiligen Hexapeptid gekuppelt. Die anschließenden Reduktionen der linearen Hexapeptide (41) und (43) zu den Verbindungen (42) und (44) verliefen analog der Reduktion des Tripeptids, genauso wie die Verseifung der Methylester. Die Zyklisierung der beiden Derivate erfolgte jeweils in DMF unter einer Konzentration von $c = 10^{-3}$ mol/L mit DPPA/ NaHCO_3 . Die Ausbeuten der Zyklisierung betrugen 52% für Verbindung (45) sowie 18% für Verbindung (46). Die sehr geringe Ausbeute von 18% im Fall von Verbindung (46) ist nicht auf eine weniger effektiv verlaufende Zyklisierung, sondern auf Probleme während der Aufreinigung zurückzuführen.

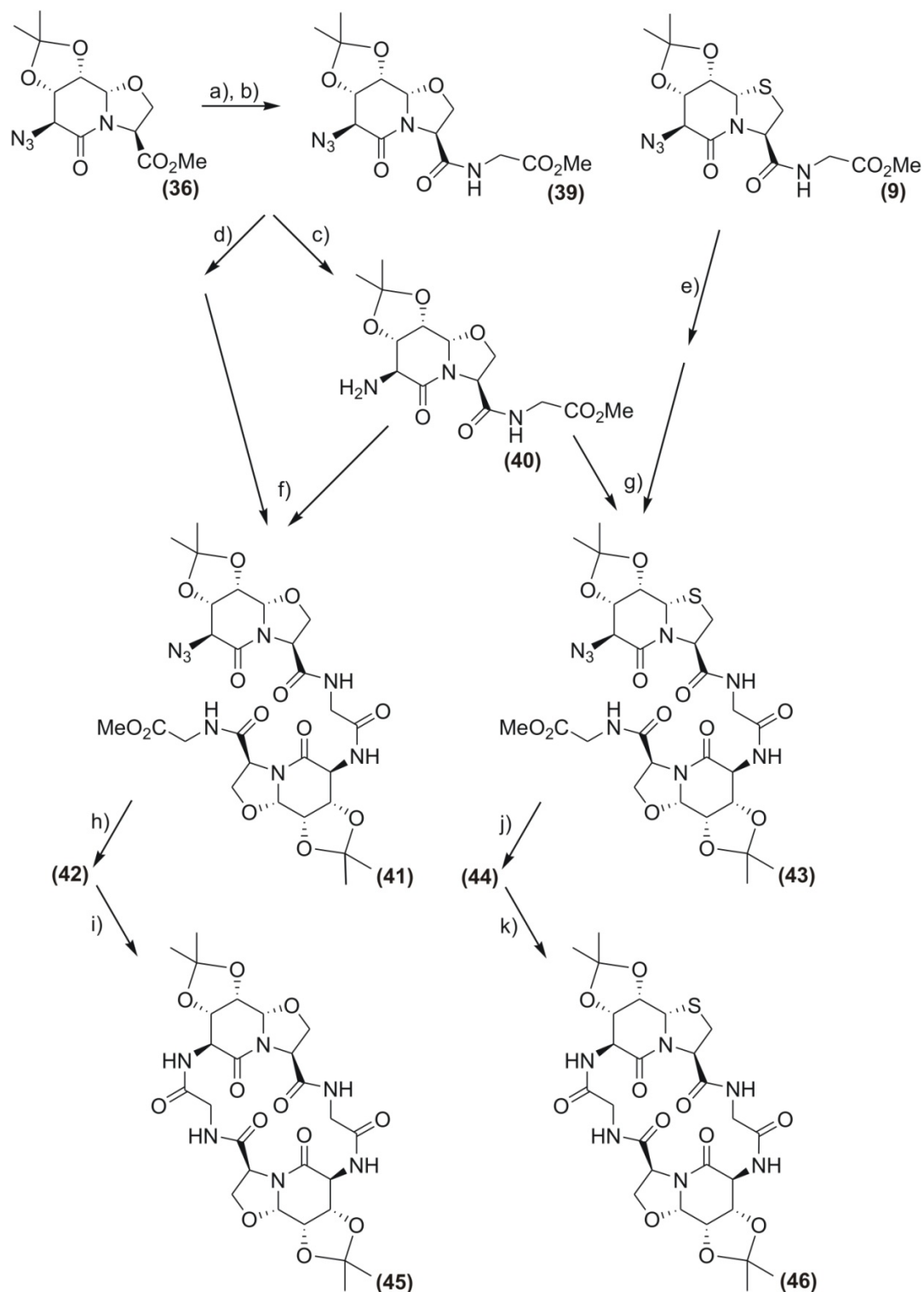


Abbildung 64 Synthese der zyklischen Hexapeptide (45) und (46) ausgehend vom Azid (36). a) Verseifen mit 1N LiOH in 1,4-Dioxan/H₂O, b) Kuppeln mit HBTU/HOBt und Glycinmethylester (96%), c) Reduzieren mit Pd/C und H₂ (84%), d) Verseifen mit 1N LiOH in 1,4-Dioxan/H₂O, e) Verseifen mit 1N LiOH in 1,4-Dioxan/H₂O, f) Kuppeln mit HBTU/HOBt (57%), g) Kuppeln mit HBTU/HOBt (78%), h) Reduzieren mit Pd/C und H₂ (96%), i) Verseifen mit 1N LiOH in 1,4-Dioxan/H₂O, Anschließend zyklisieren mit DPPA/NaHCO₃ im DMF ($c = 10^{-3}$ mol/L) (52%), j) Reduzieren mit Pd/C und H₂ (95%), k) Verseifen mit 1N LiOH in 1,4-Dioxan/H₂O, Anschließend zyklisieren mit DPPA/NaHCO₃ im DMF ($c = 10^{-3}$ mol/L) (18%).

3.5.2 Konformationsanalyse der Zyklopeptide (45) und (46)

In Übereinstimmung mit den bisherigen Ergebnissen zeigte sich auch bei den Modellpeptiden, dass kein merklicher Unterschied zwischen Oxazolidin- und Thiazolidinlactam feststellbar war.

Abgesehen von der bereits erwähnten höheren Polarität der Oxazolinderivate waren die dargestellten Modellpeptide mit den zuvor synthetisierten beinahe vollkommen identisch. Einen Beweis für die konformative Übereinstimmung liefert zum Beispiel die Betrachtung der ROESY-Spektren (Abbildung 65) der Verbindungen **(45)** und **(46)**. Zwar erscheint der NH- α -Bereich auf den

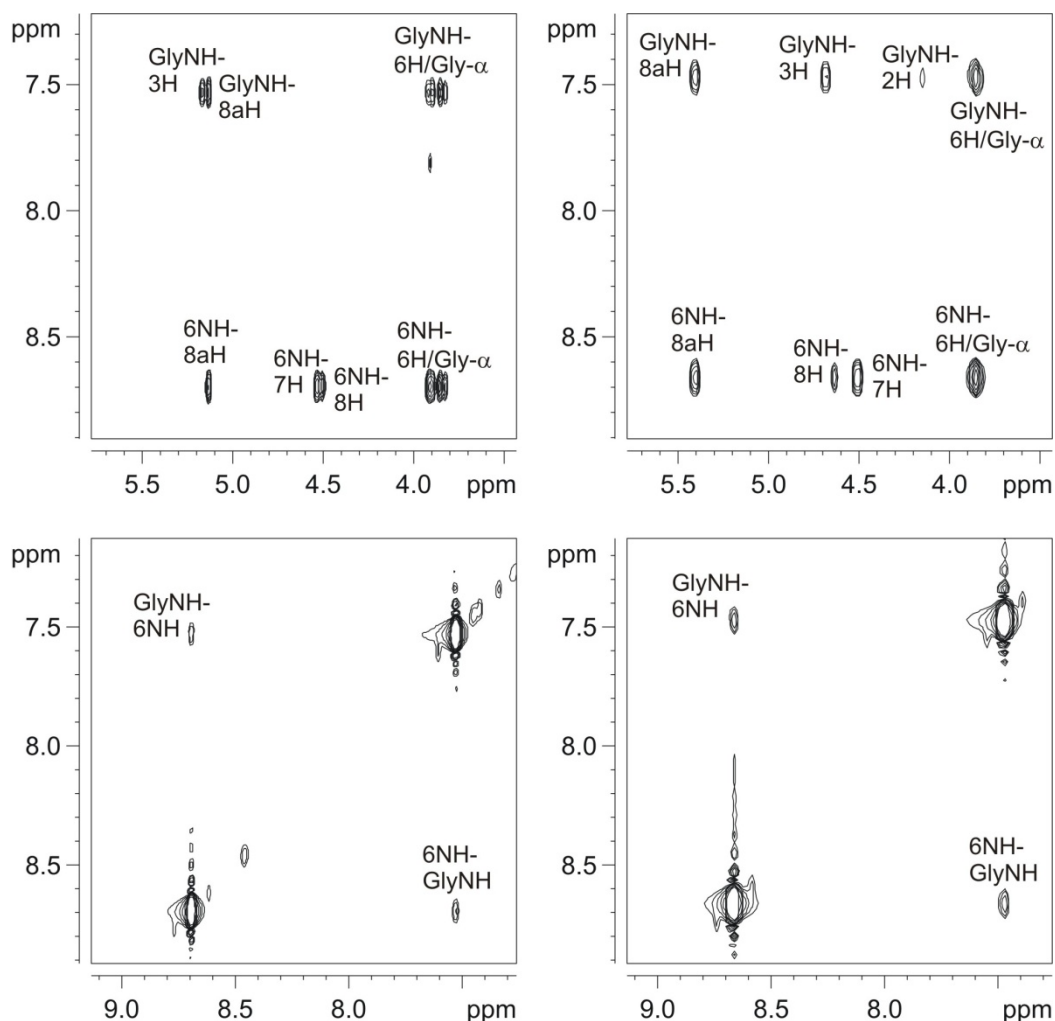


Abbildung 65 jeweils ROESY-Spektrum, 600 MHz, DMSO_{d6}. Links: (Pli^P=Cat-Gly)₂ NH- α -ROE (oben), NH-NH-ROE (unten). Rechts: (Pli^P=Cat^O-Gly)₂ NH- α -ROE (oben), NH-NH-ROE (unten). Abgesehen von leichten Unterschieden der chemischen Verschiebung zeigen die beiden ROESY identische Muster, welche auf eine gemeinsame Struktur schließen lassen.

ersten Blick recht unterschiedlich, unter Berücksichtigung der chemischen Verschiebung zeigt sich, dass die ROE-Muster auf die gleiche Konformation hinweisen. Bei näherer Betrachtung kann festgestellt werden, dass die relativen Intensitätsunterschiede der jeweiligen Signale gut miteinander korrelieren.

Um weitere Informationen hinsichtlich der Ausrichtung der amidischen Protonen und damit auch der Konformation zu erhalten, wurden die Temperaturgradienten der beiden Modellverbindungen **(45)**

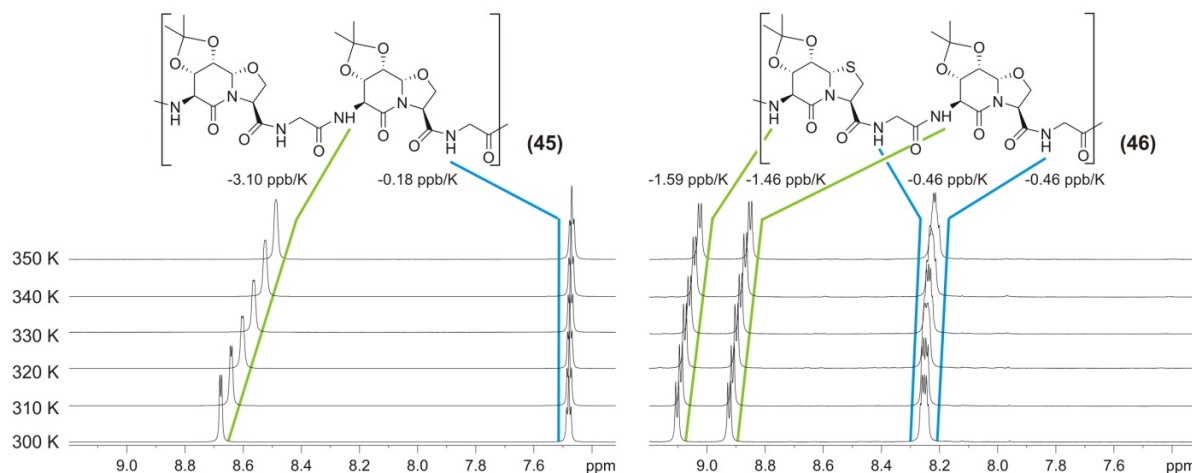
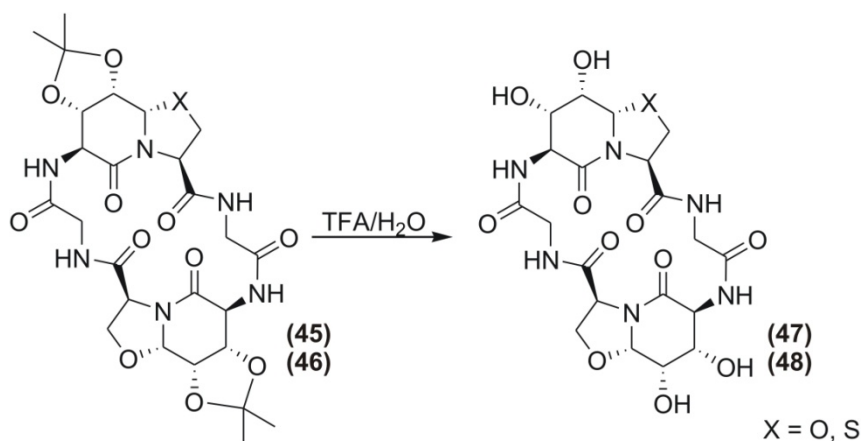


Abbildung 66 ^1H -NMR-Spektrum, 600 MHz, DMSO-d_6 , 300-350K. Gezeigt sind die Temperaturreihen der Verbindungen **(45)** (links) und **(46)** (rechts). Deutlich zu erkennen ist in beiden Spektren die starke Abschirmung der amidischen Protonen des Glycins von Lösungsmittel.

und **(46)** bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass die amidischen Protonen des Glycins sehr stark vom Lösungsmittel abgeschirmt waren (-0.18 bzw. -0.46 ppb/K). Genau wie bei den vorherigen Modellverbindungen deuten auch die Daten der Oxazolidin-Derivate auf das Vorhandensein einer Wasserstoffbrücke an der i+3ten Position an, welches als Hinweis für einen vorhandenen β -turn

gewertet werden kann.

Zuletzt erfolgte die vollständige Entschützung der Verbindungen **(45)** und **(46)** mittels TFA/Wasser 95:5 (Abbildung 67), zur Aufreinigung reichte aufgrund der hohen



Reinheit der Produkte das Ausfällen in Diethylether aus. Die Bestimmung der

Abbildung 67 Entschützen der Verbindungen **(47)** und **(48)** jeweils mit TFA/Wasser.

Temperaturgradienten der entschützten Modellpeptide **(47)** und **(48)** zeigte, dass keine erhebliche konformative Änderung durch das Entfernen der Acetale hervorgerufen wurde. Neben der Veränderung der chemischen Verschiebung einzelner Signale konnte auch eine leichte Veränderung der Temperaturgradienten der amidischen Protonen festgestellt werden; diese sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6 Temperaturgradienten der entschützten und in []-Klammern die Werte der geschützten Derivate. Gut zu erkennen ist, dass die Konformation der Hexapeptide erhalten bleibt.

	(45) [(47)] in ppb/K	(46) [(48)] in ppb/K
Gly-NH	+0.13 (-0.18)	+0.47 (-0.46) -0.32 (-0.46)
6-NH	-4.70 (-3.10)	-5.58 (-1.46) -4.38 (-1.59)

Interessant ist in diesem Zusammenhang das Auftreten von positiven $\Delta\delta$ bei den amidischen Protonen der Glycine, welche bei den entschützten Verbindungen (47) und (48) beobachtet werden konnte. Diese $\Delta\delta$ deuten, wie bereits zuvor erwähnt nicht auf einen Austausch mit dem Lösungsmittel hin sondern zeigen eine Dynamik seitens der Konformation an. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass sich die Unterschiede zwischen den Thia- und Oxazolidinlactamen auf

geringfügige Abweichungen hinsichtlich der monomeren Bausteine beschränken. Die Konformation der zyklischen Hexapeptide bleibt unbeeinflusst davon, welcher der Dipeptidbausteine Verwendung findet. Da sich jedoch der Zugang zu den Oxazolidinlactamen seitens der Kondensationsreaktion so viel schwieriger gestaltet, als die Darstellung der Thiazolidin-Derivate, haben diese im Weiteren keine Verwendung gefunden.

3.6 Darstellung und Charakterisierung eines Somatostatin-Analogons (49)

Die Substanzklasse der Somatostatine beschreibt cyclische Peptidhormone, welche als Neurotransmitter im zentralen Nervensystem fungieren und die Bildung von Somatotropin hemmen, daher auch die Bezeichnung *SRIFs: somatotropin-release inhibition factors*, sowie das Zellwachstum regulieren. Somatostatine werden in den δ -Zellen des Pankreas, den Zellen des Hypothalamus und des Gastrointestinaltrakts sowie von bestimmten Krebszelllinien gebildet.^[99-106]

Natürliches Somatostatin kommt in zwei verschiedenen Formen vor, dem Somatostatin-14 und dem Somatostatin-28, entsprechend der Namen bestehend aus 14 bzw. 28 Aminosäuren. Die Aminosäuresequenz Ala¹-Gly²-cylo(Cys³-Lys⁴-Asn⁵-Phe⁶-Phe⁷-Trp⁸-Lys⁹-Thr¹⁰-Phe¹¹-Thr¹²-Ser¹³-Cys¹⁴) beschreibt das Somatostatin-14, welches durch eine Disulfidbrücke zyklisiert ist. Insbesondere der Bereich Phe⁷-Thr¹⁰ hat sich als sehr interessant hinsichtlich der aktiven Konformation und der Synthese synthetischer Somatostatin-Analoga erwiesen.^[107-109]

Eines der bekanntesten Medikamente, welches auf dieser Primärsequenz aufbaut, ist das Octreotid oder Sandostatin®, ein zyklisches Octapeptid der Sequenz D-Phe-cyclo(Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys)-Thr(ol).^[108] Anstelle der üblichen metabolischen Halbwertszeit von < 3 min von Somatostatin-14, was den therapeutischen Einsatz natürlicher Somatostatine erschwert, besitzt dieses Zyklopeptid eine Halbwertszeit von 117 min.^[109, 110] Diese Substanzklasse erschien sehr interessant hinsichtlich der Verwendung von Pli=Cat, da der Dipeptidbaustein zum einen in der Lage sein sollte, eine passende Ausrichtung der Seitenketten von Tryptophan und Lysin durch seine konformative Auswirkung seitens des Zyklopeptids zu erreichen, zum anderen sollten die freien Hydroxylgruppen des

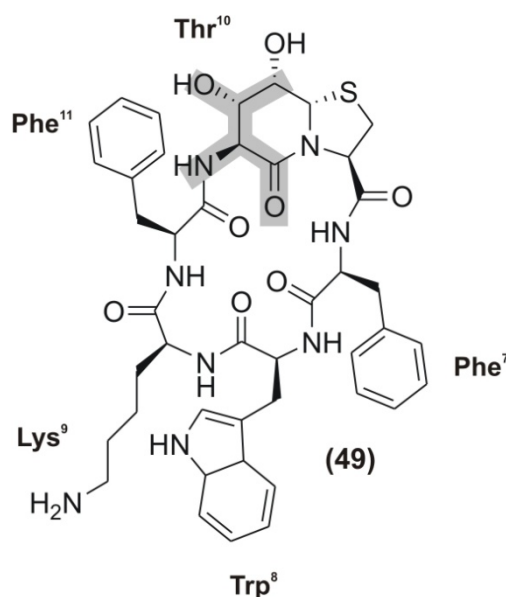


Abbildung 68 Darstellung der Zielverbindung (49) sowie Hervorhebung des Threoninanalogs.

natürlichen Somatostatin-14 vertreten war. Weiterhin sollte auf den Einsatz von D-Aminosäuren verzichtet werden, da auch diese im nativen Somatostatin nicht vorkamen. Die Verwendung von D-Tryptophan hätte zwar die Bildung eines β -turns begünstigt, jedoch sollte die passende Ausrichtung der Aminosäureseitenketten möglichst durch die konformativen Auswirkungen von Pli=Cat hervorgerufen werden. Daher wurde die Sequenz cyclo(Pli=Cat-Phe-Trp-Lys-Phe) als Zielverbindung gewählt (Abbildung 68).

Die Darstellung des linearen Vorläufers erfolgte in 0.1 millimolarem Maßstab an der Festphase, anschließend wurde dieser mit DPPA/NaHCO₃ in DMF zyklisiert. Nach einer ersten Aufreinigung wurde mit Trifluoressigsäure/Wasser entschützt und das Zyklopeptid mittels präparativer RP-HPLC

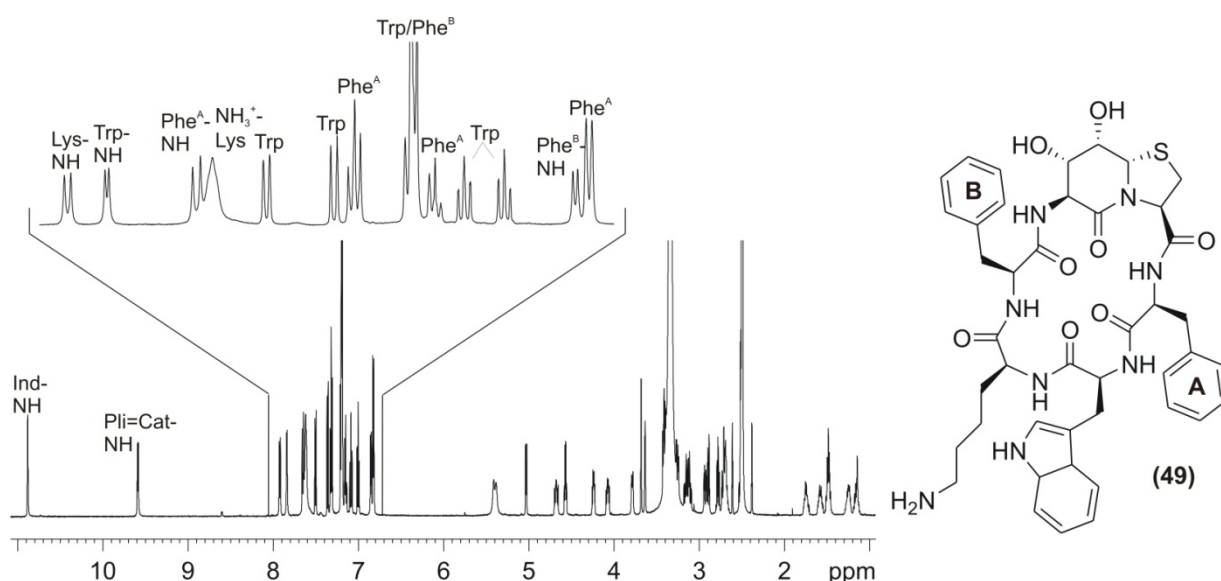


Abbildung 69 ¹H-NMR-Spektrum, 600 MHz, DMSO_{d6}. Spektrum des Somatostatin-Analogs und Spreizung des Amidbereichs von 6.8 – 8.1 ppm. Sowie rechts die Darstellung mit Kennzeichnung der Aromaten.

aufgereinigt, die Gesamtausbeute für Synthese, Zyklisierung und Entschützung betrug 20%. Das ^1H -NMR Spektrum der Verbindung (**49**) in Abbildung 69 zeigt sehr deutlich, dass es sich um eine konformativ einheitliche Verbindung handelt. Der Amidbereich erstreckt vom Pli=Cat-NH bis zum Phe^B-NH über 2.7 ppm und zeigt damit eine sehr hohe Dispersion. Auch die Aromaten-Signale des Tryptophans zeigen eine große Aufspaltung; besonders bemerkenswert ist jedoch die Dispersion der aromatischen Signale des Phenylalanins^A. Diese erstrecken sich über einen Bereich von 0.8 ppm, und liegen damit weiter auseinander als die Signale des Tryptophans.

Um diese sehr starke Dispersion zu verstehen, ist es wichtig die Orientierung der Seitenkette zu kennen. Eine Betrachtung der 3J -Kopplungskonstanten der β -Protonen des Phenylalanins^A gibt einen Hinweis. Mit einer auslesbaren Kopplungskonstante von 12.0 Hz zeigt das β -Proton eine relativ große Kopplung zum Phe^A- α , was dafür spricht, dass hier eine ekliptische Konformation vorliegt. Damit ist es sehr wahrscheinlich, dass die Seitenkette zum Inneren des Zylopeptids in Richtung des

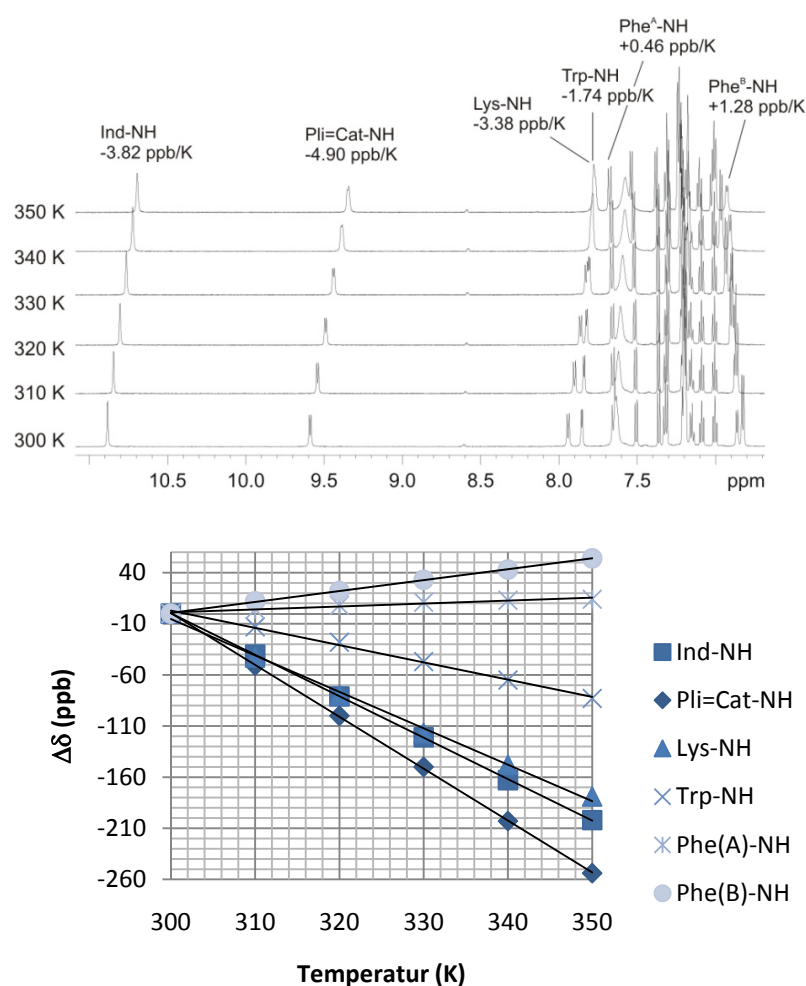


Abbildung 70 Oben: ^1H -NMR-Spektrum, 600 MHz, DMSO-d_6 , 300-350K. Zu erkennen sind die fünf amidischen Protonen sowie das Indol-NH. Unten: Graphische Auftragung der Temperaturgradienten zur Verdeutlichung des linearen Zusammenhangs.

Dipeptidbausteins hin orientiert ist. Dies erklärt letztlich auch die hohe Aufspaltung der aromatische Seitenkette des Phe^A, durch Wechselwirkung des Aromaten mit dem benachbarten Schwefelatom des Thiazolidinlactams kommt es aufgrund der Anisotropie des Schwefels zu der hier beobachteten Dispersion für das Phenylalanin^A. Die Kopplungskonstanten für das zweite Phenylalanin betragen 4.8 bzw. 5.2 Hz und deuten auf eine gestaffelte Konformation der β -Protonen. Demzufolge wäre auch die zweite Phenylalaninseitenkette zum Inneren des Zylopeptids hin orientiert. Die anschließende Bestimmung der Temperaturgradienten zeigte deutliche

Unterschiede zwischen den einzelnen amidischen Protonen. Der niedrigste Wert wurde mit einem $\Delta\delta$ von -4.90 ppb/K für das Amid des Dipeptidbausteins beobachtet, der höchste Wert betrug +1.28 ppb/K für das Amid des Phenylalanins^B (Abbildung 70). Erneut ist es möglich positive $\Delta\delta$ zu beobachten, jedoch ist dies die erste Verbindung, in der zum einen zwei Phenylalanine vorkommen und in der auch jeweils beide zugehörigen Amide ein solches Verhalten zeigen. Da beide Aromaten zum Inneren des Peptids hin orientiert sein sollten, ist eine Wechselwirkung zwischen den Phenylalanin-Amiden und den entsprechenden Seitenketten sehr wahrscheinlich. Interessant hierbei ist, dass die Ausrichtung der Seitenketten, welche mittels der Kopplungskonstanten bestimmt wurde, mit dem hier beobachteten temperaturabhängigen Verhalten der Amide sehr gut übereinstimmt. Wichtig bei dieser Betrachtung ist die Torsion von Phe^A zum Dipeptidbaustein hin. Diese Torsion der Seitenkette weg vom Amid erlaubt daher keine so effektive Wechselwirkung wie sie im Fall von Phe^B beobachtet werden kann. Durch die gestaffelte Anordnung der β -Protonen liegt die Seitenkette hier direkt über dem dazugehörigen Amid und kann so sehr viel besser mit diesem in Wechselwirkung treten. Damit liegt durch die Verbindung (49) ein erstes Beispiel vor, im dem ein direkter Zusammenhang zwischen positiven $\Delta\delta$ und der Ausrichtung der aromatischen Seitenketten hergestellt werden kann.

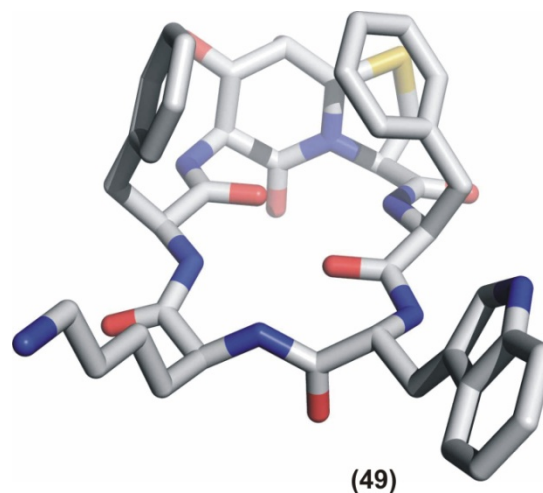
Um die Frage nach der Ausrichtung der Seitenketten von Tryptophan und Lysin abschließend klären zu können, wurde ein ROESY-Spektrum des Somatostatin-Analogons aufgenommen. Erwartungsgemäß sollten bei gleicher Orientierung der Seitenkette bedingt durch die räumliche Nähe ROE-Kontakte beobachtbar sein. Es zeigte sich jedoch, dass kein einziger Kontakt zwischen den Seitenketten beobachtet werden konnte. In Tabelle 7 sind die Relevanten ROE-Signale zusammen-

Tabelle 7 Auflistung der relevanten ROE-Kontakte, interessant hierbei sind vor allem diejenigen zwischen den Phe-NH und der Lysin Seitenkette.

Pli=Cat-NH	Lys-NH	Trp-NH	Phe ^A -NH	Phe ^B -NH
Phe ^B - α	Phe ^B -NH	Phe ^A - α	Pli=Cat-3H	Lys- α
Phe ^B - β	Trp- β	Phe ^A - β	Pli=Cat-7H	Lys-Seitenkette
Pli=Cat-7H	Lys-Seitenkette		Pli=Cat-8aH	Phe ^B -Aromaten
			Lys-Seitenkette	Pli=Cat-8aH
			Phe ^A -Aromaten	Pli=Cat-8H

gefasst. Ähnlich vorheriger Verbindungen kann auch hier beobachtet werden, dass die amidischen Protonen an den Positionen i und i+3 (Phe^A und Phe^B) einen Kontakt zum Brückenkopfproton zeigen und damit entsprechend den Rückschlüssen seitens der Temperaturgradienten ins Innere des Zyklopeptids weisen. Zwar sind keine ROE-Signale zwischen den Seitenketten des Tryptophans und des Lysins erkennbar, jedoch zwischen den Seitenketten von Phe^A, Phe^B und Lysin. Unter der Annahme, dass die aromatischen Seitenketten der Phenylalanine entsprechend Abbildung 71 orientiert sind, muss die Seitenkette des Lysins nach oben weisen, um einen ROE-Kontakt zu

ermöglichen. Die Kopplungskonstanten der β -Protonen des Tryptophans deuten mit 6.3 bzw. 8.4 Hz auf eine gestaffelte Konformation hin, wodurch das Indol in seiner Ausrichtung vom Zyklopeptid weg zeigt. Zusammenfassend wurde ein Somatostatin-Analogon mittels Festphasensynthese dargestellt und erfolgreich zyklisiert. Die Temperaturgradienten der amidischen Protonen an den Positionen i und $i+3$ deuten auf vorhandene Wasserstoffbrücken oder eine starke strukturelle



Abschirmung hin. Die Ausrichtung der Seitenketten konnte anhand von ROE-Signalen und Kopplungskonstanten bestimmt werden. Auch wenn sich letztlich zeigte, dass eine gleiche Ausrichtung der Tryptophan- und Lysinseitenketten wahrscheinlich nicht erreicht werden konnte, handelt es sich bei Verbindung **(49)** um ein sehr aufschlussreiches Zyklopeptid, welches einen interessanten Ansatz für den Zusammenhang positiver Temperaturgradienten und der Wechselwirkung mit aromatischen Seitenketten bietet.

Abbildung 71 Berechnete Struktur der Verbindung **(49)** unter Berücksichtigung der spektroskopischen Daten.

Seitens des dargestellten Somatostatin-Analogons wäre nun weiter von Interesse, die Proteolyseempfindlichkeit sowie die Auswirkung auf beispielsweise neuroendokrine Tumorzellen zu untersuchen. Da sich aber zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch keine Zusammenarbeit mit einer biomedizinischen Arbeitsgruppe ergeben hatte, sind diese Untersuchungen noch ausstehend.

3.7 Das *Alzheimer*-Peptid als Templat für die Einführung eines β -turns

Die *Alzheimer*-Krankheit ist mit weltweit 15 Millionen Erkrankten eine der am stärksten verbreiteten Formen der Demenz. Ab einem Alter von 60 Jahren verdoppelt sich statistisch das Risiko an *Alzheimer* zu erkranken alle fünf Jahre. Ein Prozent aller Menschen zwischen 60 und 64 Jahren leidet unter der *Alzheimer*-Krankheit, im Alter von 85 Jahren sind bereits 40% aller Menschen von *Alzheimer* betroffen.^[111, 112] Charakteristisch für die *Alzheimer*-Krankheit ist das Vorkommen von fibrillären Aggregaten des *Amyloid-beta*-Peptids ($A\beta$) in den zerebralen Arealen sowie die intrazelluläre Anhäufung des phosphorylierten Tau-Proteins.^[113] $A\beta$ ist ein proteolytisches Fragment des größeren *Amyloid Precursor Proteins* (APP). Der biochemische Abbau des APP kann grundsätzlich auf zwei Arten geschehen, durch die α -Secretase wird das APP derart gespalten, dass kein $A\beta$ entsteht. Nur durch die BACE-katalysierte Zersetzung des APP kann $A\beta$ im Körper freigesetzt werden.^[114] Strukturell besteht das in den Plaques gefundene $A\beta$ hauptsächlich aus 42 Aminosäuren ($A\beta_{42}$), daneben existieren aber noch weitere Formen, beispielsweise das $A\beta_{39}$, das $A\beta_{40}$ sowie

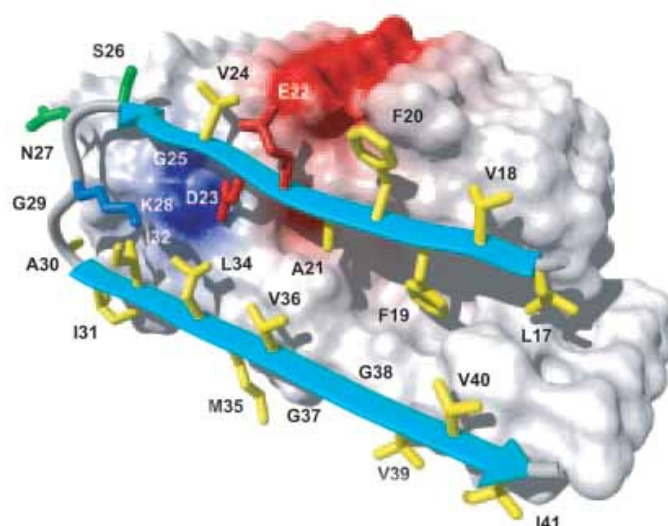


Abbildung 72 Darstellung eines Ausschnitts des Amyloid-beta-Peptids.^[119]

weitere, längerkettige Formen.^[115-117]

Versuche die Aggregation des A β zu verstehen, haben zu sehr detaillierten Strukturmodellen für die fibrillären Aggregate geführt.^[118, 119] Hierbei zeigte sich, dass der als β -Faltblatt vorliegende Bereich des A β für die Aggregation eine besonders wichtige Rolle spielt.^[120-122]

Hinsichtlich des Dipeptidbausteins ergab sich ausgehend von den strukturellen Eigenschaften des A β eine sehr interessante Fragestellung. Da die

Untersuchung der Eigenschaften von Pli=Cat sich bisher auf zyklische Hexapeptide und kleine Modellverbindungen beschränkt hatte, sollten die konformativen Auswirkungen in einem größeren Zyklopeptid untersucht werden, insbesondere ob auch in einem größeren Ringsystem durch das Mimetikum ein β -turn induziert werden könnte. Dazu sollte der Teil des β -Faltblatts von Ile³¹ bis Ile⁴¹, der entsprechend des Modells (Abbildung 72) in einer vollständig gestreckten Konformation vorlag, durch die Verwendung von Pli=Cat in ein zyklisches Peptid überführt werden. Ausschlaggebend für die Wahl dieses Bereichs des A β war die Motivation eine Sequenz zu wählen, welche nicht begünstigt sein sollte, einen β -turn auszubilden. Weiterhin sollte untersucht werden, inwiefern sich die Zyklisierung auf die unspezifische Aggregation des A β -Fragments auswirken würde.

Für die Darstellung von zyko(Pli^P=Cat^{29,30}-Ile³¹-Ile³²-Gly³³-Leu³⁴-Met³⁵-Val³⁶-Gly³⁷-Gly³⁸-Val³⁹-Val⁴⁰-Ile⁴¹) musste, bevor mit der Festphasensynthese des linearen Vorläufers begonnen werden konnte, eine geeignete Position für die Zyklisierung gewählt werden. Von Vorteil war die Verwendung eines Glycins am C-Terminus, da so kein Risiko der Epimerisierung seitens des Peptids bestand. Letztlich erfolgte der synthetische Schnitt zwischen Gly³⁷ und Gly³⁸, da vermutet wurde, dass eine Flexibilität des N-Terminus seitens des Glycins die Zyklisierung erleichtern würde.

3.7.1 Synthese und NMR-Strukturaufklärung des Zyklopeptids (50)

Die Synthese des linearen Vorläufers NH₂-Gly³⁸-Val³⁹-Val⁴⁰-Ile⁴¹-Pli^P=Cat^{29,30}-Ile³¹-Ile³²-Gly³³-Leu³⁴-Met³⁵-Val³⁶-Gly³⁷-OH erfolgte in 0.4 millimolarem Maßstab mittels automatisierter Festphasensynthese, anschließend wurde unter milden Bedingungen mit DCM/TFE/HOAc 7:2:1 abgespalten. Die Festphasensynthese des Vorläufers lieferte jedoch anstelle der erwarteten 0.4 nur 0.17 mmol der gewünschten Verbindung. Die Zyklisierung wurde mit DPPA/NaHCO₃ in DMF unter einer Verdünnung von $c = 10^{-2}$ mol/L durchgeführt. Nach der Aufreinigung durch RP-HPLC konnten 20 mg der Verbindung (**50**) erhalten werden. Zwar war die Ausbeute in diesem Fall mit 10% im

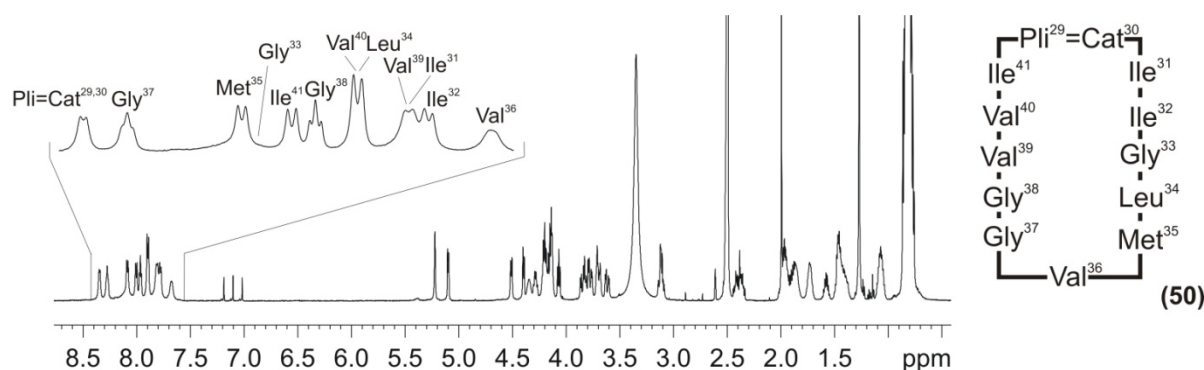


Abbildung 73 ¹H-NMR-Spektrum, 600 MHz, DMSO_{d6}. Darstellung der Verbindung (50) inklusive der Spreizung des Amidbereichs zwischen 7.6 und 8.4 ppm sowie die schematische Abbildung des Zyklopeptids.

Vergleich zu früheren Zyklisierungen nicht besonders hoch, unter Berücksichtigung der Größe des 39-gliedrigen Rings, stellen auch 10% eine ausreichende Ausbeute dar.

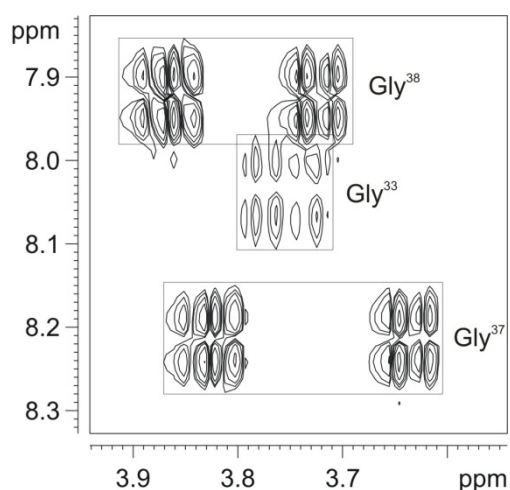


Abbildung 74 DQF-COSY-Spektrum, 600 MHz, DMSO_{d6}. Identifizierung von Gly³³, dessen NH durch die Verbreiterung anfangs nicht zugeordnet werden konnte.

Zuordnung der Signale war zum einen die geringe Dispersion, zum anderen die Tatsache, dass die Aminosäuren Glycin, Isoleucin und Valin jeweils dreimal vertreten waren. Zunächst erfolge die Zuordnung der Glycine, wobei zwei von dreien bereits durch ihre Kopplungsmuster identifiziert werden konnten. Die Lage des dritten Glycins konnte anhand des COSY-Spektrums ausgemacht werden (Abbildung 74). Da Glycin wegen der diastereotopen Methylengruppe als einzige Aminosäure zwei ³J_{NH,α}-Kopplungen zeigt, war die Zuordnung des dritten Glycins relativ einfach. Es zeigte sich, dass das amidische Proton dieses Glycins so stark verbreitert war,

Das in Abbildung 73 gezeigte ¹H-NMR Spektrum zeigt deutlich, dass die Verbindung (50) abgesehen von Ammoniumsalzen (Triplet bei 7.10 ppm) weitestgehend frei von Verunreinigungen ist. Auffallend ist die geringe Dispersion des Amidbereichs von gerade einmal 0.8 ppm. Dieses deutet darauf hin, dass das Zyklopeptid aufgrund seiner Dynamik nicht in der Lage ist, eine Vorzugskonformation einzunehmen. Zur weiteren Analyse der Verbindung (50) musste zuerst eine Zuordnung der beobachteten Signale erfolgen, dieses soll im Nachfolgenden anhand von Beispielen näher erläutert werden. Erschwerend hinsichtlich der

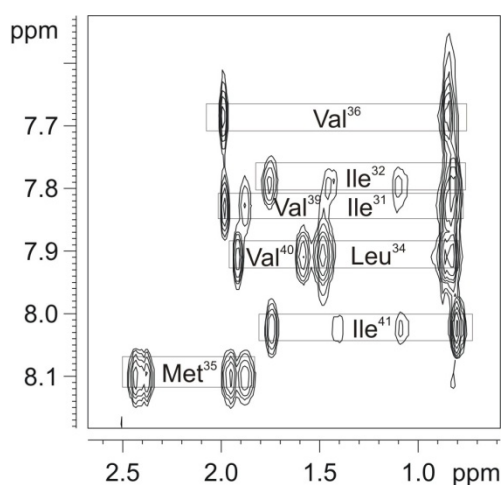


Abbildung 75 TOCSY, 600 MHz, DMSO. Dargestellt sind die Spinsysteme im Alkylbereich, welche zur Zuordnung der amidischen Protonen gedient haben.

dass es im ^1H -NMR Spektrum nicht identifiziert werden konnte (Abbildung 73). Die Zuordnung der übrigen Aminosäuren erfolgte mittels eines TOCSY-Spektrums. Dabei war die Zuordnung des Amids des Dipeptidbausteins besonders einfach möglich, da das dazugehörige Spinsystem des Sechsrings anhand des TOCSY-Spektrums sowie durch seine gut separierten Signale sehr leicht bestimmt werden konnte. Die Identifikation des Methionins gestaltete sich ähnlich einfach, da dieses durch die diastereotopen β -Protonen zugeordnet werden konnte (Abbildung 75). Letztlich war es möglich, durch die TOCSY Muster der einzelnen Aminosäuren jede einzelne, trotz der Überlagerung von $\text{Leu}^{34}/\text{Val}^{40}$ und $\text{Ile}^{31}/\text{Val}^{39}$, zuzuordnen.

Aufgrund der Überlagerung der Carbonyle der einzelnen Aminosäuren im HMBC-Spektrum war eine Sequenzierung mittels $\text{NH}-\alpha\text{-CO}$ nicht möglich, jedoch zeigte sich, dass die Bestimmung der Sequenz mittels $\text{NH}-\alpha\text{-NOEs}$ im ROESY-Spektrum sehr gut möglich war. Nachfolgend soll am Beispiel der Abfolge $\text{Gly}^{33}\text{-Leu}^{34}\text{-Met}^{35}\text{-Val}^{36}$ die Sequenzierung erläutert werden (Abbildung 76). Ausgehend von einem Paar $\text{Gly}-\alpha$ -Protonen findet sich ein NOE-Kontakt zu einem Leu-NH . Da nur ein Leucin in der Verbindung vorhanden war, konnte die Zuordnung getroffen werden, dass es sich um Gly^{33} und (bereits bekannt) Leu^{34} handelte. Diese Zuordnung wurde weiterhin dadurch gestützt, dass ein $\text{NH}-\alpha$

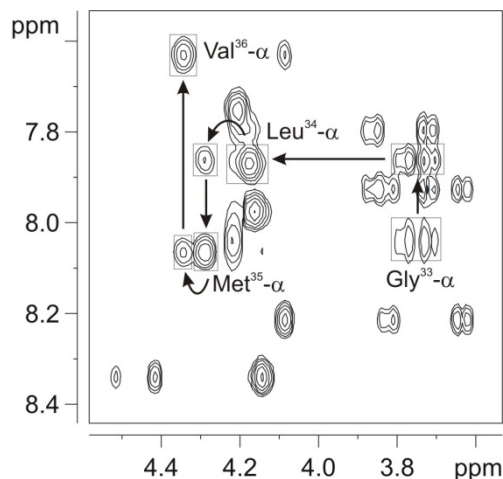


Abbildung 76 NOESY-Spektrum, 600 MHz, DMSO-d_6 . Gezeigt ist die Abfolge von $\text{NH}-\alpha$ -Kontakten zur Identifizierung der Sequenz $\text{Gly}^{33}\text{-Leu}^{34}\text{-Met}^{35}\text{-Val}^{36}$.

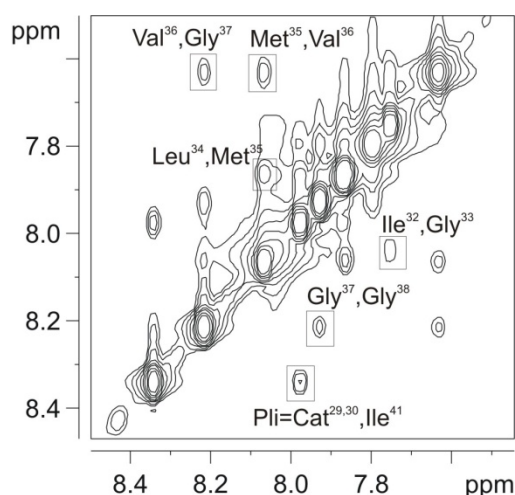


Abbildung 77 NOESY-Spektrum, 600 MHz, DMSO-d_6 . Die gezeigten $\text{NH}-\text{NH}$ Kontakte sind ausschließlich auf benachbarte Aminosäuren zurückzuführen

NOE zwischen Leu^{34} und Met^{35} vorhanden war. Ein weiterer Kontakt vom $\text{Met}^{35}\text{-NH}$ wies zu einem Valin- α , welches dadurch als Val^{36} identifiziert werden konnte. So fortgehend konnte eine vollständige Zuordnung des Zyklopeptids erfolgen, welche es ermöglichte, eine weiterreichende konformative Untersuchung durchzuführen.

Die erneute Betrachtung des NOESY-Spektrums zeigte, dass Abgesehen von einem NOE-Kontakt zwischen dem amidischen Proton des Ile^{31} und dem Brückenkopfproton des $\text{Pli}=\text{Cat}^{29,30}$ keine strukturelevanten Kontakte identifiziert werden konnten. Auch der Ausschnitt des

Amidbereichs des NOESY-Spektrums enthielt keine zusätzlichen Informationen, da alle hier vorhandenen $\text{NH}-\text{NH}$ NOEs nur zu den jeweils benachbarten Aminosäuren verwiesen. Jedoch unterstützen die hier beobachteten NOEs die zuvor getroffene Zuordnung.

Die Bestimmung der Temperaturgradienten sollte abschließend zusätzliche Informationen hinsichtlich der Konformation liefern, dafür wurde der Temperaturbereich zwischen 300 und 350 K gewählt. Dabei zeigte sich, dass die Temperaturerhöhung eine bessere Auflösung der amidischen Protonen von Gly³⁷ und Val³⁶ zur Folge hatte (Abbildung 78). Dies kann damit begründet werden,

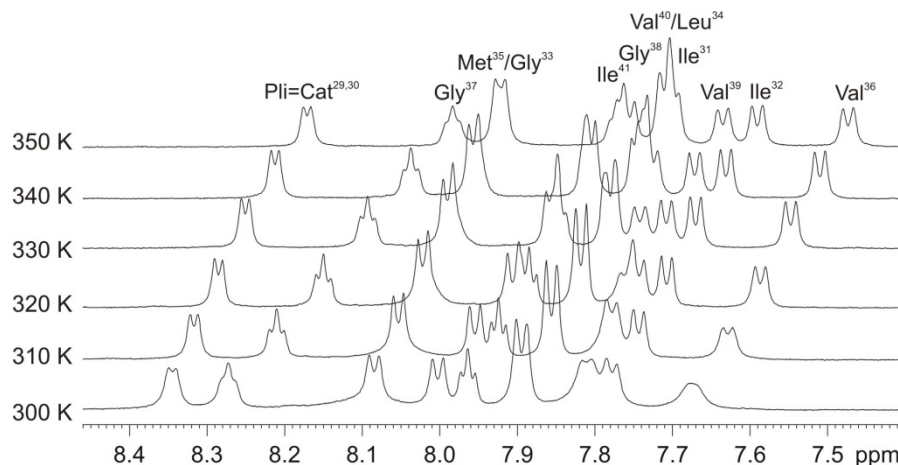


Abbildung 78 ¹H-NMR-Spektrum, 600 MHz, DMSO_{d6}, 300-350K. Gut zu erkennen ist die bessere Auflösung verschiedener Signale bei höherer Temperatur, genauso wie eine leichte Zunahme der Dispersion.

dass das Zyklopeptid bei Raumtemperatur einer konformativen Dynamik unterliegt, welche von Ihrer Austauschgeschwindigkeit mit der NMR-Zeitskala korreliert. Durch das Erhöhen der Temperatur wird der konformative Austausch beschleunigt, so dass dieser nicht mehr aufgelöst werden kann und es wird nur noch ein gemittelt Signal beobachtet. Weiterhin verdeutlicht Abbildung 78 die Unterschiede der verschiedenen Temperaturgradienten. Während die größte Temperaturabhängigkeit für Gly³⁷ mit -5.80 ppb/K gemessen wurde, liegt die kleinste bei -1.75 ppb/K für Ile³¹ (Tabelle 8). Zwar entspricht der Wert von -1.75 ppb/K nicht den ansonsten beobachteten Temperaturgradienten, welche im Bereich von <-1.00 ppb/K lagen, jedoch ist Verbindung (**50**) auch die erste zyklische Verbindung, die eine verstärkte konformative Dynamik zeigt. Am Beispiel von Verbindung (**50**) zeigt sich erneut, dass die Aminosäure an der i+3ten Position, also die Aminosäure nach Pli=Cat, den niedrigsten Temperaturgradienten zeigt. Dieses bestätigt die Annahme, dass auch in einem 39-gliedrigen Ring durch das Mimetikum ein β -turn induziert werden kann. Weiterhin

Tabelle 8 Auflistung aller Temperaturgradienten der Verbindung (**50**).

	Pli=Cat ^{29,30}	Ile ³¹	Ile ³²	Gly ³³	Leu ³⁴	Met ³⁵
$\Delta\delta$ (ppb/K)	-3.52	-1.75	-3.74	-3.28	-3.80	-3.28
	Val ³⁶	Gly ³⁷	Gly ³⁸	Val ³⁹	Val ⁴⁰	Ile ⁴¹
$\Delta\delta$ (ppb/K)	-3.88	-5.80	-4.00	-3.80	-3.60	-4.80

konnte damit nachgewiesen werden, dass Pli=Cat sogar in der Lage war den β -Strang einer relativ starren Polypeptidkette in eine Schleifenstruktur zu überführen.

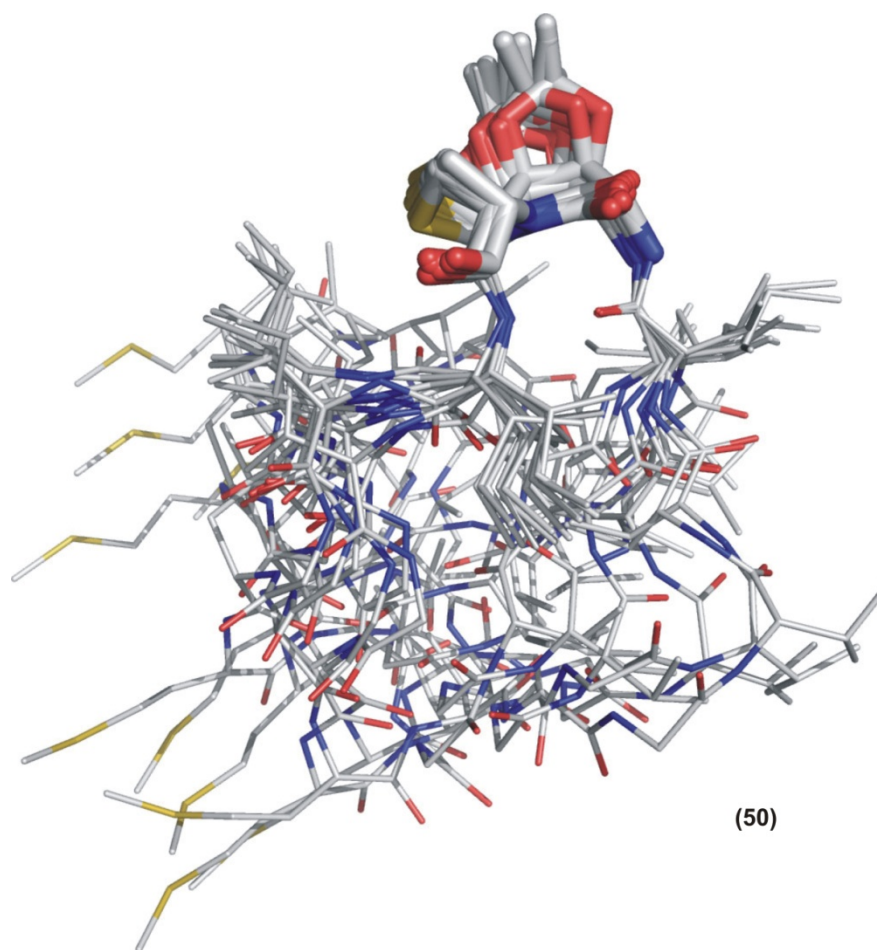


Abbildung 79 Berechnete Strukturen von (50). Aufgenommen nach jeweils 10 ps Relaxationszeit, gut zu erkennen ist die Dynamik der Seitenketten und großer Teile des zyklischen Grundgerüsts, während der Bereich um $\text{Pli}^{\text{P}}=\text{Cat}$ nur geringen Schwankungen unterliegt.

In Abbildung 79 sind die berechneten Strukturen von (50) dargestellt. Hierfür wurde eine Moleküldynamik durchgeführt und jeweils nach 10 ps eine Aufnahme der aktuellen Konformation getätigt. Das Übereinanderlegen der so erhaltenen Einzelspektren ergab die gezeigte Abbildung. Gut zu erkennen ist die hohe Dynamik des 39-gliedrigen Rings, vor allem die Seitenketten sowie große Teile des Peptidrückgrats erscheinen sehr flexibel. Einzig der Bereich um den Dipeptidbaustein erscheint in seiner Konformation weitestgehend festgehalten. Dieses Bild skizziert sehr deutlich das beobachtete konformative Verhalten der Verbindung (50), da es sich jedoch um eine berechnete Struktur handelt, sollte diese nicht dazu herangezogen werden, Rückschlüsse auf die tatsächliche Konformation zu ziehen.

In Hinsicht auf das Vorhaben, eine *Turn*-Konformation innerhalb eines β -Faltblatts hervorzurufen, kann gesagt werden, dass dieses ohne Einschränkungen möglich war. Anhand der NMR-spektroskopische Zuordnung der Sequenz konnte auf sehr eindrucksvolle Weise das Vorgehen beim vorliegen größerer Peptide erläutert werden. Alle vorhandenen spektroskopischen Daten deuten auf eine *Turn*-Konformation hin und bestätigen die zuvor getroffenen Annahmen.

3.8 Click-Reaktionen am Azid des Dipeptidbausteins

Um zu überprüfen, ob es möglich sei mittels einer [3,2]-dipolare Cycloaddition eine Ligation zwischen einem beliebigen Alkin und einem Azido-Dipeptidbaustein durchzuführen, sollten die Verbindungen **(5)** und **(36)** jeweils mit einem Alkin umgesetzt werden. Insbesondere seitens des Schwefels im Thiazolidin bestand die Befürchtung, dass dieser mit den Kupfersalzen in Wechselwirkung treten könnte, so dass die Reaktion nur schlecht ablaufen könnte. Als Alkin-Modellverbindung diente Boc-Gly-OPrg, die N- und C-terminal geschützte Aminosäure konnte über zwei Stufen mit einer Ausbeute von 92% ausgehend von Glycin dargestellt werden.

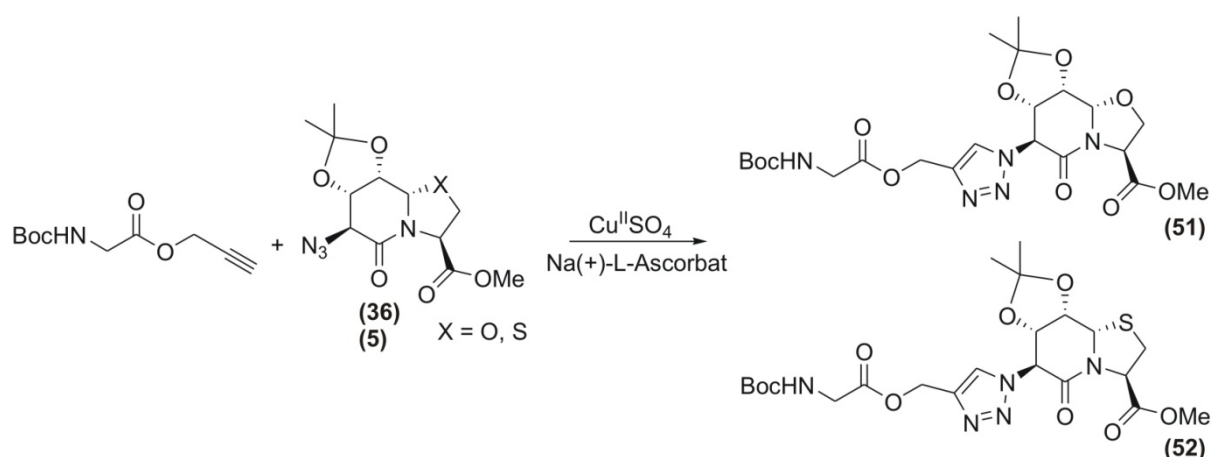


Abbildung 80 Schematische Darstellung der Click-Reaktion der Azide (36) und (5) mit Boc-Gly-OPrg unter Cu^{I} -Katalyse (97% (51) und 81% (52)).

Erste Versuche der Click-Reaktion scheiterten, so dass kein Triazol gebildet wurde, erst nach Zugabe einer höheren Anzahl von Äquivalenten des $\text{Na}(+)\text{-L-Ascorbat}$ konnte ein Umsatz beobachtet werden (Abbildung 80).

Es zeigte sich, dass die Reaktion in Gegenwart von etwa sieben Äquivalenten $\text{Na}(+)\text{-L-Ascorbat}$ zu einer vollständigen Bildung des 1,4-Triazols führte. Die Reaktionsdauer beschränkte sich hierbei auf eine Stunde und die Ausbeuten betrugen 97% für Verbindung (51) sowie 81% für Verbindung (52). Zu erwähnen ist, dass die relativ niedrige Ausbeute von 81% auf Löslichkeitsprobleme seitens der Aufarbeitung zurückzuführen ist, welche im Fall der Verbindung (51) umgangen werden konnten.

Dass die Ligation mittels Click-Chemie über das N-terminale Azid eines Dipeptidbausteins möglich ist, konnte somit nachgewiesen werden, weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Reaktionen äußerst schnell und unter sehr guten Ausbeuten abliefen.

Die Dipeptidbausteine $\text{Pli}^{\text{P}}=\text{Cat}$ und $\text{Pli}^{\text{P}}=\text{Cat}^{\text{O}}$ eignen sich dementsprechend nicht nur zur standardmäßigen Peptidkupplung, sondern können auf einfache Weise auch für die Ligation durch die Click-Chemie eingesetzt werden. Diese Eigenschaft erhöht nochmals das Spektrum an Einsatzmöglichkeiten der beiden Dipeptidbausteine.

3.9 Oligomere Peptidmimetika

Durch die Verwendung oligomerer, nichtnatürlicher Gerüststrukturen ist es möglich, konformativ eingeschränkte Sekundärstrukturelemente zu erzeugen. Die Bezeichnung Foldamer, welche von *Gellman* geprägt wurde, bezeichnet grundsätzlich jedes Oligomer, welches in der Lage ist eine spezifische kompakte Konformation einzunehmen.^[123]

Die Arbeiten von *Gellman* und *Seebach* bezogen sich hierbei insbesondere auf β -Peptide und die Bildung von helikalen Strukturelementen.^[124-127] Die Nachahmung der Eigenschaften von β -Peptiden verbunden mit der zusätzlichen konformativen Einschränkung des Peptidrückgrats wurde beispielsweise durch die Verwendung norbornenbasierter β -Peptidmimetika erreicht.^[128] Auch die Verwendung von carbopeptiden Oligomeren, welche ebenfalls β -Peptidmimetika darstellten, führte zur Bildung helikaler Strukturen.^[129] Die Bildung von β -Faltblättern konnte unter Verwendung von alkinverknüpften Indolidonen erreicht werden.^[130] In der Arbeitsgruppe Geyer konnte ein Hexapeptid bestehend aus drei Dipeptideinheiten – jeweils einem 7,5-bizyklischen Thiazolidinlactam – aufgebaut werden. NMR-spektroskopische Untersuchungen zeigten hierbei, dass dieses Peptid trotz der geringen Größe in der Lage war, eine PPII-helikale Struktur einzunehmen.^[56] In Anlehnung an diese vorherige Arbeit sollte das Verhalten von Pli=Cat Oligomeren untersucht werden.

3.9.1 Darstellung der Dipeptidmimetikums-Oligomere

Die konformative Stabilität von Pli=Cat wurde in den bisherigen Abschnitten bereits weitreichend untersucht. Im nachfolgenden soll auf die Struktur von Pli=Cat Oligomeren eingegangen werden. Fraglich in diesem Zusammenhang war, ob die Dipeptidmimetikums-Oligomere eine übergeordnete Struktur bilden würden, und falls ja, wie diese aussehen würde. Unter der Voraussetzung, dass Pli=Cat eine starre, „U-förmige“ Struktur aufweist, ergaben sich zwei Möglichkeiten für die Struktur eines solchen Polypeptids. Zum einen bestand die Möglichkeit, dass die Oligomere eine stark

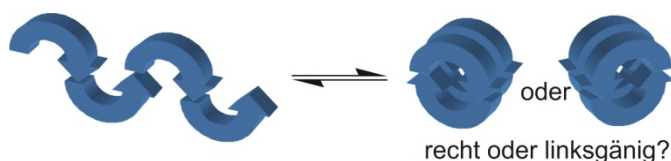


Abbildung 81 Darstellung der möglichen Ausrichtungen eines oligomerisierten Turn-Mimetikums; links die gestreckte Struktur, rechts die m- bzw. p-helikale Anordnung.

gestreckte, zum anderen eine helikale Struktur einnehmen würden. Beide denkbare Strukturen sind in Abbildung 81 dargestellt.

Die Synthese der Oligomere sollte mittels Fragmentkupplung in Lösung stattfinden.

Zum einen wurde davon ausgegangen, dass die N- und C-terminal geschützten Peptide relativ gut mittels Flashchromatographie aufzureinigen wären, zum anderen wären für die Festphasensynthese sehr große Mengen des Fmoc-Dipeptidbausteins für die Synthese notwendig gewesen. Ähnlich der Synthese der zyklischen Hexapeptide sollte der N-Terminus als Azid geschützt vorliegen. Dadurch war eine hydrogenolytische Freisetzung möglich, welche den als Methylester geschützten C-Terminus

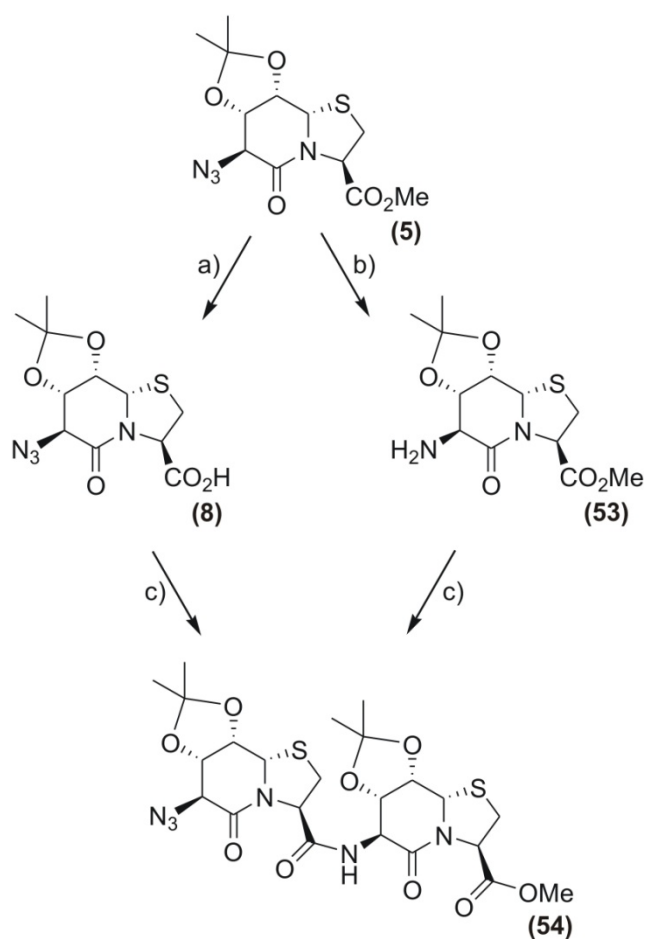


Abbildung 82 Synthese des Tetrapeptids (54) ausgehend vom Dipeptidazid (5). a) Verseifen mit 1N LiOH in 1,4-Dioxan/H₂O, b) Reduzieren mit Pd/C und H₂ (99%), c) Kuppeln mit HBTU/HOBt (44%).

genauso wie die Isopropylidengruppe des Diols nicht beeinflusste. Ausgehend vom Azid (5) erfolgte die Synthese des ersten Tetrapeptids, respektive des Di-Mimetikums in drei Schritten. Das Azid wurde anteilig in 1,4-Dioxan/Wasser mit 1N LiOH verseift bzw. mit Palladium/Kohle und Wasserstoff zum Amin (53) reduziert. Die anschließende Kupplung der beiden Dipeptidfragmente erfolgte mit HBTU/HOBt und DIPEA und lieferte epimerisierungsfrei das Tetrapeptid (54) (Abbildung 82). Die Stabilität des Dipeptidbausteins hinsichtlich der Epimerisierung am C-Terminus kann damit begründet werden, dass die Bildung eines Oxazolidinons aufgrund des tertiären Amids nicht möglich ist. Die relativ geringe Ausbeute von 44% des gewünschten Peptids nach chromatographischer Aufreinigung beruhte wahrscheinlich vor allem auf der sterischen Anforderung der Dipeptidfragmente.

Die chromatographische Aufreinigung des Tetrapeptids erwies sich als relativ einfach, da die Polarität der Verbindung (54) sehr gering war. Hier zeigte sich erneut der große Vorteil der Isopropylidenschutzgruppe, welche die Handhabung somit stark vereinfachte.

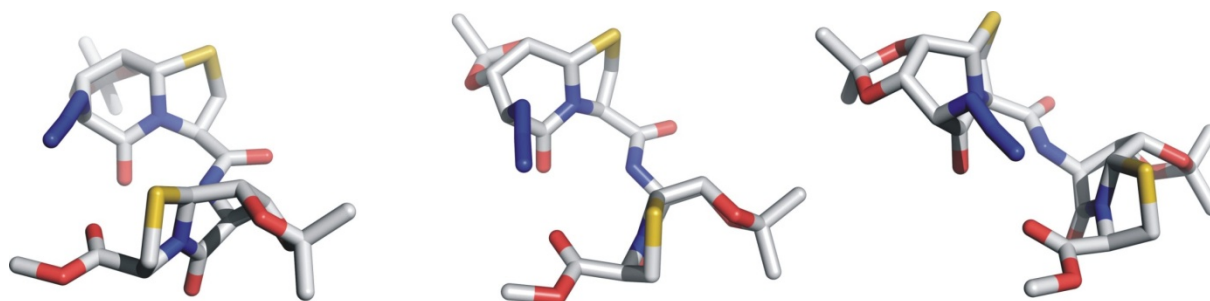


Abbildung 83 Darstellung der Kristallstruktur von Verbindung (54) aus drei verschiedenen Blickwinkeln zur Verdeutlichung der Konformation.

Seitens der NMR-spektroskopischen Untersuchung von (54) ergaben sich keine strukturelevanten Daten, weshalb die Struktur in Lösung nicht bestimmt werden konnte. Jedoch gelang die

φ_1	ϕ_1	φ_2	ϕ_2	φ_3	ϕ_3
-66.4°	-88.0°	39.7°	-167.1°	-77.7°	-89.9°

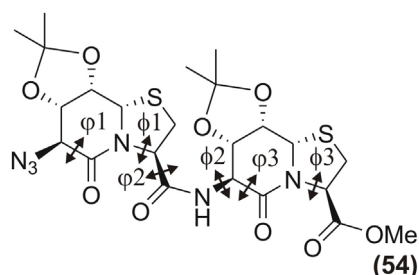


Abbildung 84 Torsionswinkel des Tetrapeptids (54), zu erkennen ist die deutliche Übereinstimmung der Winkel ϕ_1 und ϕ_3 sowie φ_1 und φ_3 .

Kristallisation des Tetrapeptids, wodurch die Konformation im Feststoff mittels Kristallstrukturanalyse aufgeklärt werden konnte. Die erhaltene Konformation ist in Abbildung 83 dargestellt. Zu erkennen sind drei verschiedene Ausrichtungen, welche jeweils um nur wenige Grad gegeneinander verdreht sind. Dadurch wird die Konformation des Tetrapeptids deutlich. Vom N- zum

C-Terminus bildet sich eine rechtsgängige, helikale Struktur aus.

Dass bereits das Tetrapeptid eine rechtsgängige Helix andeuten würde, war nicht erwartet worden, dadurch wurde aber umso mehr die Vermutung gestützt, dass größere Pli=Cat-Oligomere eine noch weit besser definierte Struktur zeigen sollten. In Abbildung 84 sind die Torsionswinkel ϕ und φ des

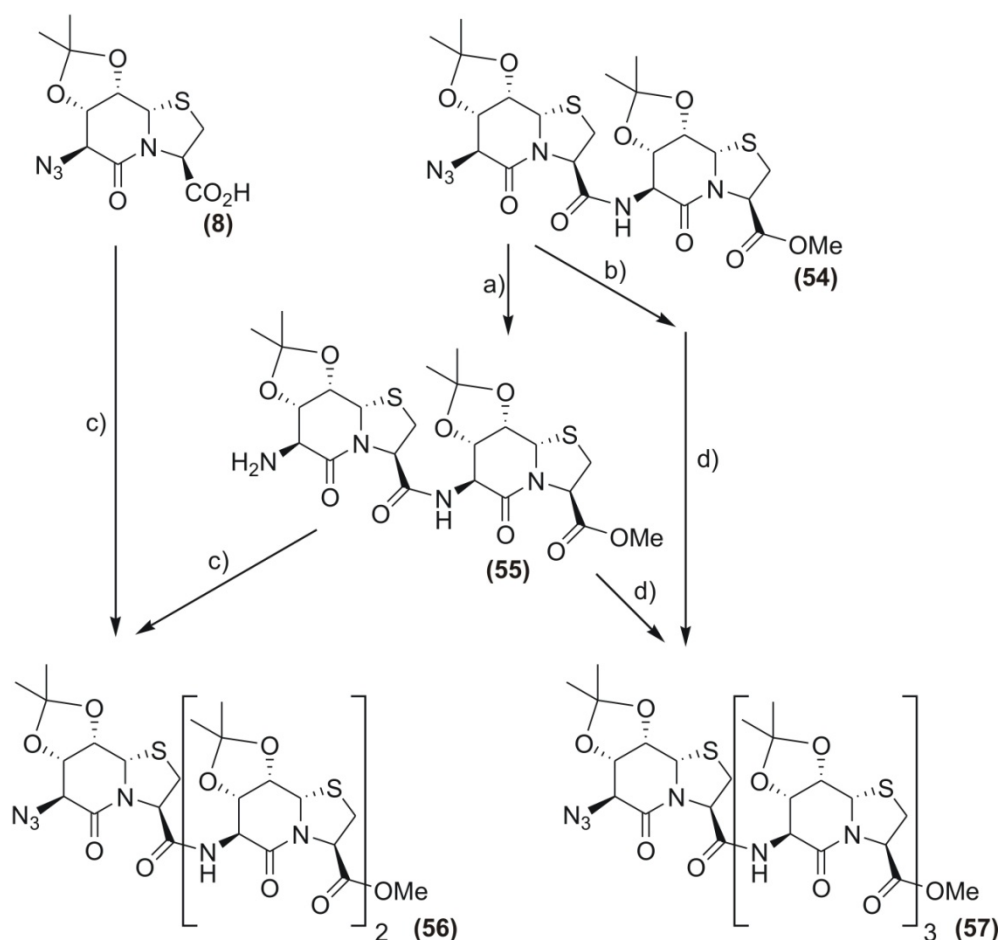


Abbildung 85 Syntheschema der Verbindungen (56) und (57) ausgehend vom Tetrapeptid (54). a) Reduzieren mit Pd/C und H₂ (99%), b) Verseifen mit 1N LiOH in 1,4-Dioxan/H₂O, c) Kuppeln mit HBTU/HOBt (39%), d) Kuppeln mit HBTU/HOBt (56%).

Tetrapeptids aufgelistet, dort zeigt sich, wie sich die Winkel ϕ_1 und ϕ_3 sowie φ_1 und φ_3 konsistent fortsetzen, was für die Beibehaltung einer einheitlichen Konformation der Dipeptidbausteine spricht. Die weitere Synthese beinhaltete die Darstellung der Hexa- und des Octapeptide **(56)** und **(57)** ausgehend von der zuvor vorgestellten Verbindung **(54)**. Dazu wurde das Tetrapeptid anteilig wie bereits zuvor beschrieben reduziert oder verseift. Anschließend erfolgte die Kupplung der beiden Tetrapeptidfragmente zum Octapeptid **(57)** bzw. die Kupplung der Verbindung **(55)** mit dem

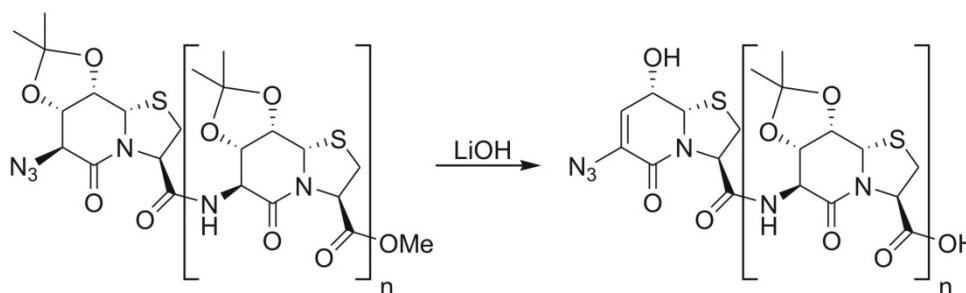


Abbildung 86 Auftretende Nebenreaktion der Verseifung. Wahrscheinlich findet eine Eliminierung der 7-OH statt.

verseiften Dipeptidbaustein **(8)** zum Hexapeptid **(56)** (Abbildung 85). Die Darstellung des Hexapeptids gelang mit einer Ausbeute von 39%, die Ausbeute des Octapeptids betrug 56%.

Bei der Verseifung des Tetrapeptids zeigte sich erstmals das Problem, dass der azidgeschützte, N-terminale Dipeptidbaustein unter Baseneinfluss zur Eliminierung neigte (Abbildung 86). Die chromatographische Abtrennung des Eliminierungsprodukts war auf der Stufe der freien Säure nur sehr schlecht möglich, daher erfolgte die Aufreinigung jeweils erst nach der Fragmentkupplung. Wegen der sehr geringen Polaritätsunterschiede zwischen Produkt und eliminiertem Nebenprodukt war teilweise eine mehrfache chromatographische Aufreinigung notwendig. Es zeigte sich, dass die Verwendung von sehr geringen Überschüssen des LiOH sowie möglichst kurze Reaktionszeiten die Eliminierung bis auf ein Minimum reduzieren konnte. Mit zunehmender Größe wurde trotz allem die jeweilige Aufreinigung der Polypeptidkette immer anspruchsvoller. Was die Polarität der verschiedenen Oligomere betraf, so konnten neben einer geringfügigen Zunahme kaum Unterschiede hinsichtlich der Kettenlänge beobachtet werden.

Die NMR-spektroskopische Untersuchung des Octapeptids **(57)** zeigte sich als besonders aufschlussreich. Zum Einen konnte eine vollständige Zuordnung aller Signale erfolgen, zum Anderen waren bereits erste strukturelevante ROE-Kontakte vorhanden. In Abbildung 87 ist ein Ausschnitt des ROESY-Spektrums der Verbindung **(57)** gezeigt, dabei sind die weitreichenden ROE-Kontakte hervorgehoben sowie rechts davon nochmals graphisch dargestellt. Diese lassen darauf schließen, dass, wie bereits vermutet, eine helikale Struktur vorliegen sollte. Eine gestreckte Struktur

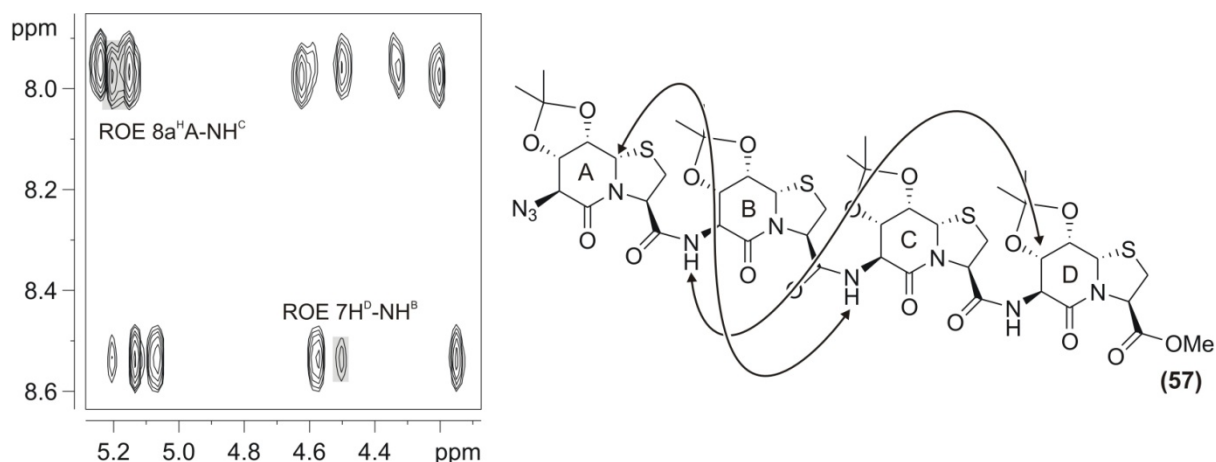


Abbildung 87 Links: ROESY-Spektrum, 600 MHz, DMSO_{d6}. Zu erkennen sind ROE-Kontakte zwischen den amidischen Protonen und dem 8aH bzw. dem 7H verschiedener Dipeptidbausteine welche auf eine helikale Struktur hindeuten. Rechts: Graphische Darstellung der hervorgehobenen ROE-Kontakte.

des Dipeptid-Oligomers kann ausgeschlossen werden, da die Distanz zwischen den betreffenden Protonen in einer solchen strukturellen Anordnung zu groß wäre.

Zuletzt erfolgte die Synthese eines Dodeca- und eines Hexadecapeptids ausgehend von den Verbindungen **(56)** und **(57)**. Analog zu den vorherigen Umsetzungen wurde das jeweilige Azid anteilmäßig verseift bzw. reduziert und die Fragmente anschließend mit HBTU/HOBt gekuppelt. Die Ausbeuten betrugen nach der chromatographischen Aufreinigung 23% für die Verbindung **(58)** und 8% für die Verbindung **(59)**. Die außerordentlich geringe Ausbeute des Hexadecapeptids ist der

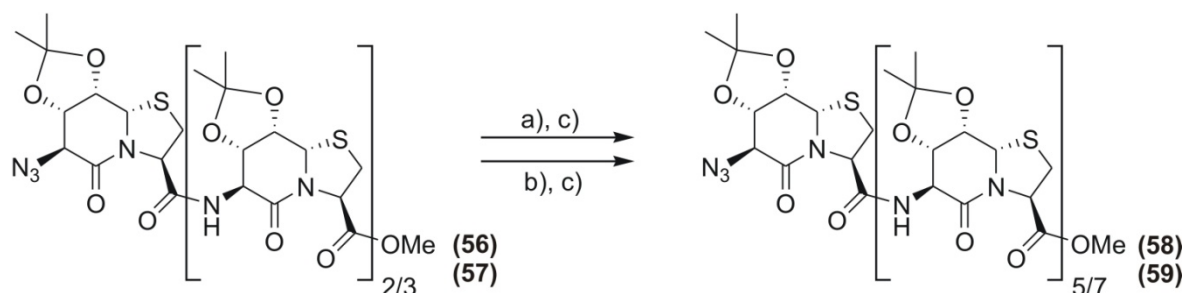


Abbildung 88 Synthese der Verbindungen **(58)** und **(59)**. a) Reduzieren mit Pd/C und H₂, b) Verseifen mit 1N LiOH in 1,4-Dioxan/H₂O, c) Kuppeln mit HBTU/HOBt (23% **(58)** bzw. 8% **(59)**).

chromatographischen Aufreinigung geschuldet, welche bis zur vollständigen Aufreinigung dreimal durchgeführt werden musste.

Der Vergleich der spektroskopischen Daten der vorliegenden Oligomere zeigte, dass mit zunehmender Größe des Peptids die Dispersion des Amidbereichs stark zunahm. Während bei dem Hexapeptid **(56)** die amidischen Signale 0.31 ppm auseinanderlagen, betrug die Dispersion beim Hexadecapeptid **(59)** bereits 0.90 ppm (Abbildung 89). Allerdings kann auch beobachtet werden, dass die Dispersion ab der Größe eines Dodecapeptids nur noch geringfügig zunimmt. Dieses deutet darauf hin, dass im Bereich dieser Größe die Strukturbildung abgeschlossen ist. Das Hinzukommen zusätzlicher Dipeptidbausteine bedeutet keine strukturelle Veränderung mehr, sondern bedingt

ausschließlich die Vergrößerung der bestehenden Struktur. Das Verhalten des Oligomers ähnelt stark einem von Geyer *et al.* beschriebenen Oligosaccharid, welches ebenfalls eine helikale Struktur ausbildete.^[131] Sehr interessant ist auch das Verhalten der Amide am N- und C-Terminus. Das Amid mit der stärksten Tieffeldverschiebung kann jeweils dem N-terminalen Amid zugeordnet werden, hingegen kann das C-terminale Amid durch seine Kopplungskonstante identifiziert werden.

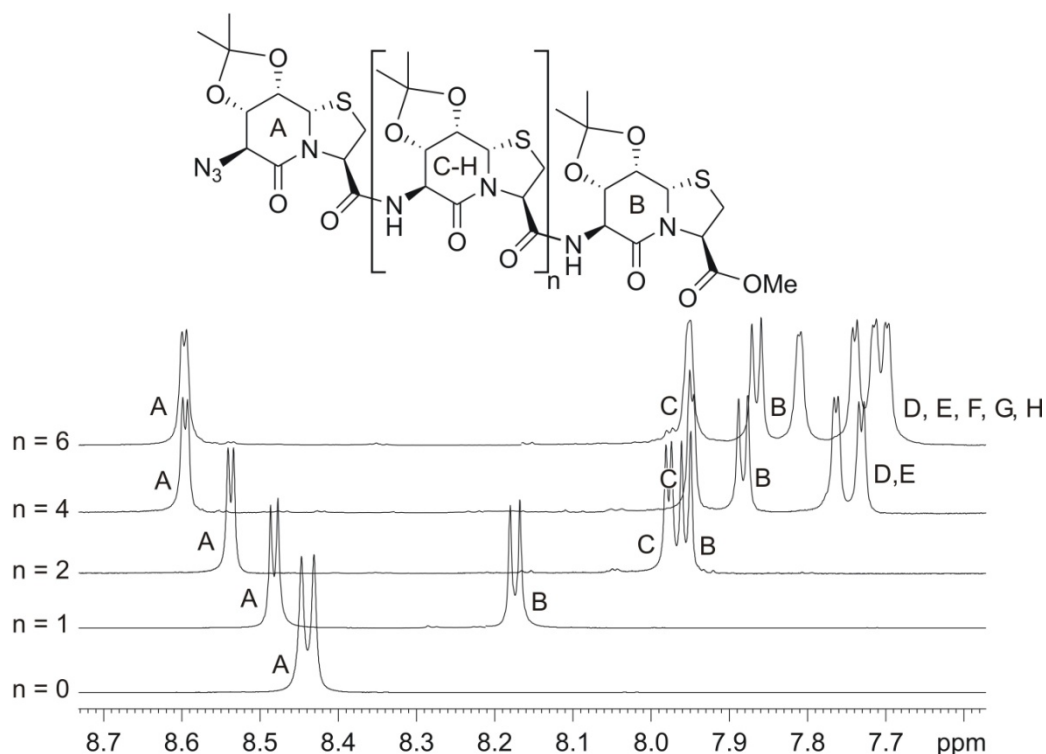


Abbildung 89 ¹H-NMR, 500/600 MHz, DMSO. Dargestellt ist der amidische Bereich der verschiedenen Oligomere. Deutlich zu erkennen ist, dass seitens der Dispersion die maximale Aufspaltung beinahe erreicht ist.

Diese bewegt sich stets zwischen 7.9 Hz und 7.1 Hz und zeigt vom Octa- zum Dodecapeptid eine leichte Hochfeldverschiebung, verbleibt dann aber seitens der Verschiebung bei einem Wert von etwa 7.9 ppm. Insbesondere N- und C-Terminus zeigen keine zusätzliche Dispersion mehr, wodurch die Vermutung, dass eine maximale Strukturbildung im Bereich dieser Größenordnung stattgefunden hat, gestützt wird. Daher wurde auf die recht aufwendige Synthese noch größerer oligomerer Dipeptidbausteine verzichtet. Die Bestimmung der Temperaturgradienten zeigte, dass bei zunehmender Kettenlänge die Gradienten der Amide, die sich in der Mitte der Struktur befanden, kleiner wurden. Diese Abnahme lässt erneut auf die Bildung einer übergeordneten Struktur schließen, welche sich in Abhängigkeit von der Kettenlänge ausbildete. Erneut konnte aber auch beobachtet werden, dass der Trend zu kleineren Temperaturgradienten ab dem Dodecapeptid stagnierte (Abbildung 90). In diesem Zusammenhang kann ausgehend von den Temperaturgradienten ebenfalls auf eine helikale Struktur geschlossen werden. Nur so kann begründet werden, dass die Amide innerhalb der Struktur relativ stark vom Lösungsmittel abgeschirmt sind.

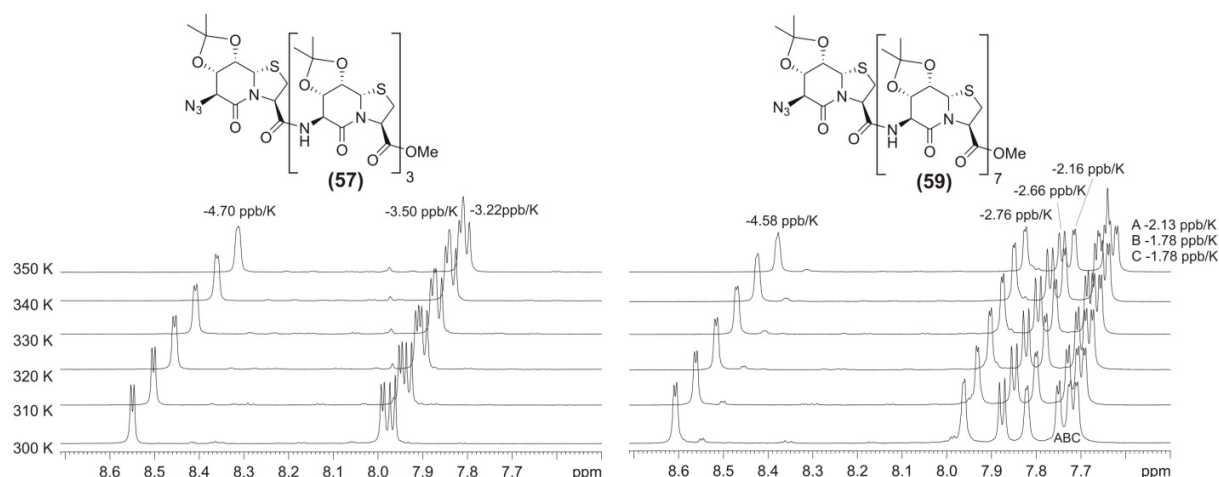


Abbildung 90 ^1H -NMR, 600 MHz, DMSO, 300-350K. Dargestellt sind die Verbindungen (57) (links) und (59) (rechts). Während die Gradienten der N-terminalen Amide, jeweils das am stärksten tieffeldverschobene Amid, beinahe konstant bleiben, gehen die übrigen Temperaturgradienten mit steigender Kettenlänge deutlich zurück.

Ähnlich einer α -Helix scheinen alle Amide zu einem weiteren Carbonyl innerhalb des Peptids orientiert zu sein. Eine mögliche Anordnung ist in Abbildung 91 zu sehen. Leider war eine exakte Berechnung der Struktur anhand der vorliegenden Daten nicht möglich. Wegen der Überlagerungen

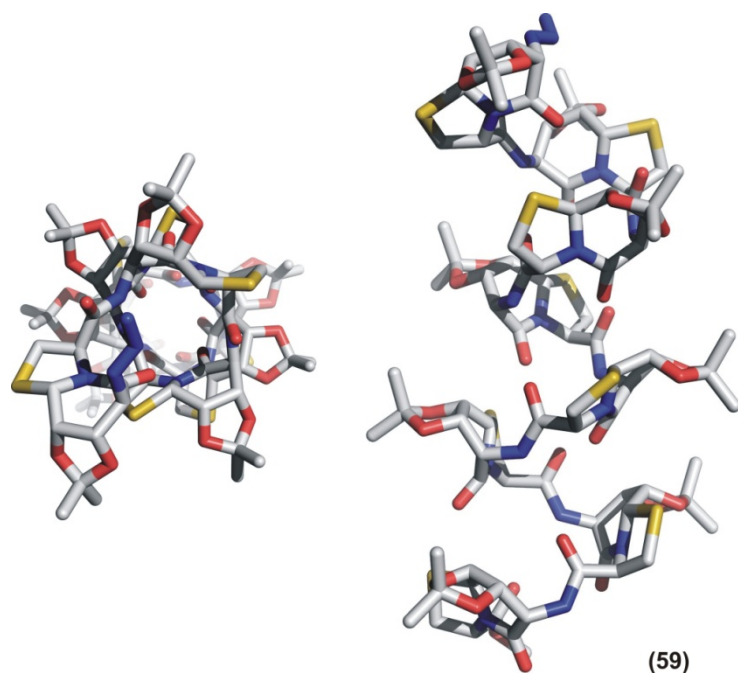


Abbildung 91 Mögliche Struktur der Verbindung (59) ausgehend von den erhaltenen spektroskopischen Daten.

der Signale im ^1H - und ^{13}C -NMR war eine vollständige Zuordnung nur bis zum Octapeptid möglich. Damit verbunden konnten keine strukturelevanten ROE-Kontakte der Verbindungen (58) und (59) zugeordnet werden. Dieses wäre jedoch für die exakte Strukturbestimmung notwendig gewesen, da, wie bereits erwähnt, die vollständige Strukturbildung erst ab dem Dodecapeptid abgeschlossen war. Weiterhin war es somit auch nicht möglich die Ringgröße der Helix zu bestimmen, ausgehend von

Verbindung (57) deuteten die erhaltenen spektroskopischen Daten auf einen 14-gliedrigen Ring. Zusammenfassend konnte ein Hexadecapeptid ausschließlich bestehend aus Dipeptideinheiten aufgebaut werden. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die relevante Größe für die Ausbildung der vollständigen helikalen Struktur zwischen 6 und 8 Dipeptideinheiten lag.

4 T4 Bakteriophage, Fibrin und Foldon

Die T4 Bakteriophage ist ein doppelsträngiger DNA Virus, welcher *Escherichia coli* als Wirt nutzt. Das T4 Viron ist aus über 40 verschiedenen Proteinen aufgebaut und besteht aus zwei strukturellen Hauptelementen: Einem ikosaedrischen Kopf- und ein einem zusammenziehbaren Schwanzteil welcher eine C_6 -Symmetrie aufweist (Abbildung 92).^[133] Die Schwanzbodenplatte, eine hexagonale

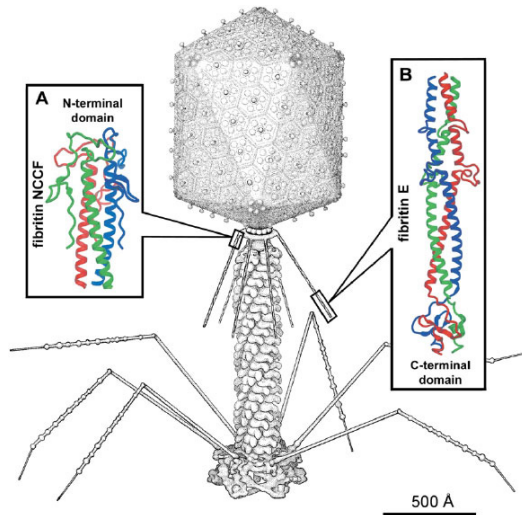


Abbildung 92 Darstellung einer T4-Phage.^[132]

Substruktur, welche sich dem Kopfteil gegenüberliegend am Schwanz befindet, ist mit sechs langen sowie sechs kurzen Schwanzfasern verbunden, welche für die Erkennung und Anbindung an die Wirtszelle verantwortlich sind. Ein weiteres Set aus sechs Fibrillen, welche als *whiskers* bezeichnet werden, befindet sich am Kopfteil des Schwanzes. Diese Fibrillen werden durch das Fibrin, ein gestrecktes, trimeres Protein, welches aus 486 Aminosäuren besteht, gebildet.^[134] Neben der Funktion des Fibrins, die Anlagerung *distaler* und *proximaler* Teile der langen Schwanzfasern zu beschleunigen, wirkt es zusätzlich als rudimentäres Tastorgan.^[135] Der Aufbau des Fibrins besteht aus einer N-terminalen Domäne (AS 1-46), welche für die Verknüpfung des Fibrins mit der Phage verantwortlich ist, weiter einem mittleren *coiled-coil* Bereich (AS 47-456) und einer kurzen globulären C-terminalen Domäne (457-486).^[136] Da die C-terminale Domäne für die Trimerisierung und Faltung des Fibrins *in vivo* und *in vitro* notwendig ist, wurde diesem Bereich die Bezeichnung Foldon zugewiesen.^[137-139] Es wird davon ausgegangen, dass es sich beim Foldon um eine evolutionär optimierte Domäne handelt, da die einzige Funktion des Foldons auf die Bildung eines Trimers hinzielt.^[138] Die native Struktur des Foldons kann als trimerer β -Faltblatt-Propeller umschrieben werden, welcher sich aus drei monomeren β -Schleifen-Segmenten zusammensetzt.^[137] Innerhalb des Trimers setzt sich das Foldon-Monomer aus einem gestreckten N-terminalen Bereich (Gly1-Gln11), einem β -Faltblatt (Ala12-Leu23) und einer C-terminalen 3_{10} -Helix (Leu23-Leu27) zusammen. Der gestreckte N-terminale Bereich enthält eine PPII-Helix zwischen den Resten Pro4 und Pro7 und lagert sich über hydrophobe Wechselwirkungen an eine Seite des β -Faltblatts an.^[140]

Kinetische Daten weisen darauf hin, dass die Faltung des Foldons ein mehrstufiger Prozess ist, in dem die Trimerisierung ausgehend vom entfalteten Peptid innerhalb von Submillisekunden stattfindet.^[141] Das Trimer wird zum einen durch hydrophobe Wechselwirkungen der drei Trp20 untereinander, durch eine intermolekulare Salzbrücke zwischen Glu5 und Arg15 sowie durch eine intermolekulare

Peptid-Rückgrat-Wechselwirkung zwischen Tyr13 und Arg15 stabilisiert (Abbildung 93). Durch Expression der Foldon-Domäne (AS 475-483) konnte ein isoliertes, stabiles Trimer gewonnen werden, welches reversibel thermisch entfaltet werden konnte.^[142] Eine Entfaltung des Foldons kann ebenfalls durch Veränderung des pH-Wertes, der Konzentration sowie beispielsweise durch Zugabe von Guanidiniumchlorid hervorgerufen werden. Mittels der Guanidiniumchlorid-induzierten Entfaltung konnte so auch das ΔG der Trimerisierung mit -89 kJ/mol bestimmt werden.^[141]

Selbst bei Temperaturen von 75° C oder SDS-Konzentrationen von bis zu 2% (w/v) findet eine Trimerisierung des Foldons statt.^[137] Aufgrund dieser hohen Stabilität wurde das Foldon bereits mehrfach als Templat für die Bildung trimerer Strukturen verwendet. *Engel et al.* konnte durch Anbindung eines Collagenstrangs bestehend aus (GlyProPro)₁₀ mittels eines kurzen Linkers an das Foldon zeigen, dass so die Bildung der

Collagen-Tripelhelix beschleunigt werden konnte.^[143] In der Arbeitsgruppe von *Sodroski* konnten lösliche gp 140 Glycoproteine des HIV Typ I Virus durch Anbindung an das Foldon hergestellt werden. Weiterhin zeigten diese Glycoprotein-Trimere trotz der Modifikation hohe Affinitäten in verschiedenen Antikörpertests.^[144] Der

Nachweis, dass die Wechselwirkung eines Glycoproteins des Tollwut-Virus mit dem p75^{NTR} Neurotrophin-Rezeptor

in der trimeren Form des Proteins stattfindet, konnte in der Arbeitsgruppe *Tuffereau* erfolgreich durch Expression des Proteins und Verknüpfung des C-Terminus mit dem Foldon gezeigt werden.^[145]

In anderen Arbeiten konnte die erfolgreiche Anbindung und Kristallisation von Adenovirus-Fasern mit dem Foldon als Templat nachgewiesen werden. Dadurch konnten gut handhabbare trimere beta-strukturierte Faserproteine als neuartige Modellverbindungen dargestellt werden.^[146]

Frühere Studien trimerer Proteine befassten sich vor allem mit großen faserartigen Proteinen, welche eine extrem langsame und auch komplexe, irreversible Faltung zu Aggregaten zeigten. Die geringe Größe und die hohe Trimerisierungsneigung des Foldon machen diese Verbindung daher zu einem sehr guten Modellsystem für die Proteinfaltung.^[147]

Im Vergleich zu bisher untersuchten kleineren multimeren Proteinen oder Proteinfragmenten, bei denen die Anlagerung vor allem durch Helix-Helix-Wechselwirkungen zustande kommt, findet die Trimerisierung des Foldons gesteuert durch den β -turn statt. Am Beispiel des Foldons konnte gezeigt

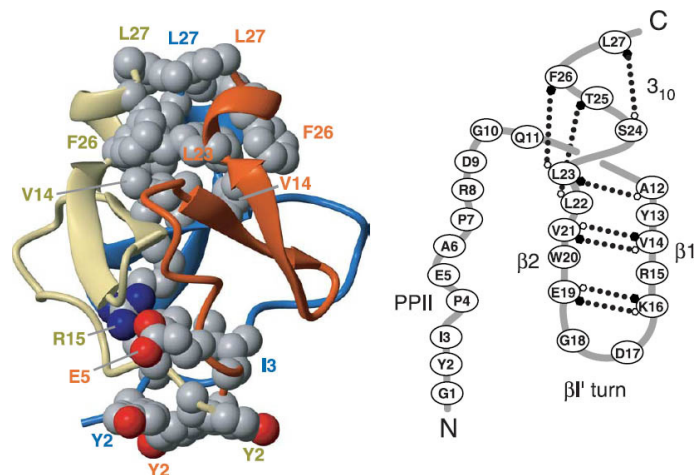


Abbildung 93 Links: Darstellung der 3d-Struktur eines Foldon-Trimers.

Rechts: Sequenz des Foldons (AS1-27).^[140]

werden, dass β -turns eine schnelle und spezifische Bildung von intermolekularen Wechselwirkungen während der Proteinfaltung unterstützen.^[141]

4.1 Synthese artifiziieller Foldonderivate

4.1.1 Vorüberlegungen

Hinsichtlich Faltung und Trimerisierung war das Foldon bereits weitreichend untersucht, bis dato war aber nur von der Arbeitsgruppe *Kiefhaber* versucht worden, das Foldon selbst durch Modifikationen zu verändern. Hierbei wurde Glu5 gegen Arg ausgetauscht, um so die Trimerisierung zu verhindern und die Untersuchung eines einzelnen Foldonstrangs mittels NMR-Spektroskopie zu ermöglichen.^[148]

Die gezielte Veränderung des Foldons durch Substitution unter Beibehaltung der Trimerisierungseigenschaften war jedoch bisher noch nicht erfolgt.

Die Motivation seitens der Foldonsynthese bestand zum einen darin, die Darstellung des Foldons zu erleichtern und zum anderen Pli=Cat in einem funktionellen Miniprotein untersuchen zu können. Die Synthese des Foldons wird durch das Vorkommen von zwei Asp-Gly-Einheiten in der Primärsequenz erschwert.^[149-152] In der Festphasensynthese führt diese Sequenz unter normalen Bedingungen zur Aspartimidbildung. Diese ist in Abbildung 94 dargestellt, ausgehend von der Asp-Gly-Sequenz bildet sich unter Piperidineinfluss das Aspartimid aus. Durch Einwirkung von Base kommt es zur

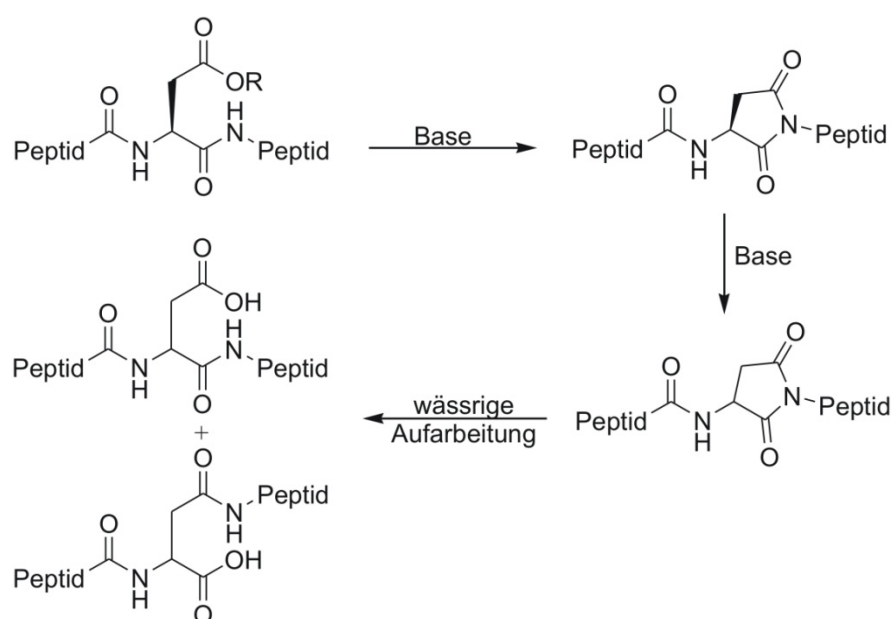


Abbildung 94 Ablauf der Aspartimid-Bildung sowie der anschließende Epimerisierung und Hydrolyse zum α - und β -Peptid.^[149]

Epimerisierung des Aspartimids, die Hydrolyse liefert letztlich eine Mischung aus α - und β -Peptiden. Die Aspartimidbildung kann durch den Wechsel des Lösungsmittels oder der Base verringert werden, genauso durch die Zugabe von HOBt oder von 2,4-Dinitrophenol während der Entschützung. Die vollständige Vermeidung des Aspartimids kann letztlich aber nur durch N-Alkylierung des Glycins erreicht werden. Gängige Schutzgruppen hierfür sind Hmb (2-Hydroxy-4-methoxybenzyl) und Dmb

(2,4-Dimethoxybenzyl), diese verhindern effektiv die Aspartimidbildung und können unter sauren Bedingungen abgespalten werden.^[153, 154]

Im Fall des Foldons sollte das Aspartimid-Problem mittels einfacher Substitutionen gelöst werden. So sollte die Asp-Gly-Sequenz an den Positionen 17 und 18, welche ohnehin einen β -turn bildet, durch Pli=Cat ersetzt werden (Abbildung 95). Erwartungsgemäß sollte die Verwendung des Dipeptidmimetikums zu einer Stabilisierung des β -turns führen, wobei unklar war, inwiefern eine höhere konformative Einschränkung des Turns sich auf die Stabilität des Foldon-Trimers auswirken würde. Eine Substitution

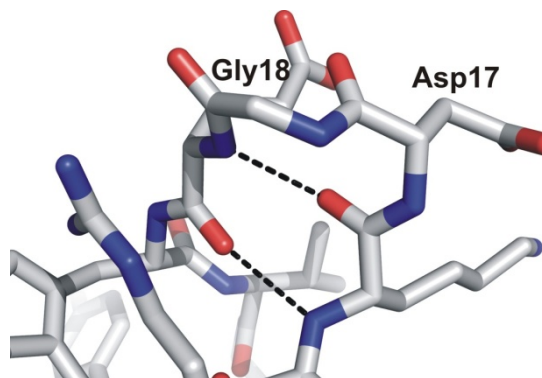


Abbildung 95 Ausschnitt aus der Kristallstruktur von Engel et al., die den β I'-turn im Bereich um Asp17-Gly18 zeigt.^[143]

musste hierbei nicht zwangsläufig zu einer Stabilisierung führen, da durch die starke Einschränkung des Peptidrückgrats gegebenenfalls andere, für die Faltung ebenfalls wichtige Konformationen nicht mehr eingenommen werden konnten.

Um die Asp-Gly-Sequenz an den Positionen 9 und 10 umgehen zu können, wurden zwei Ansätze gewählt. Zum einen sollte Asp9 gegen Glu unter der Annahme, dass die zusätzliche Methylengruppe

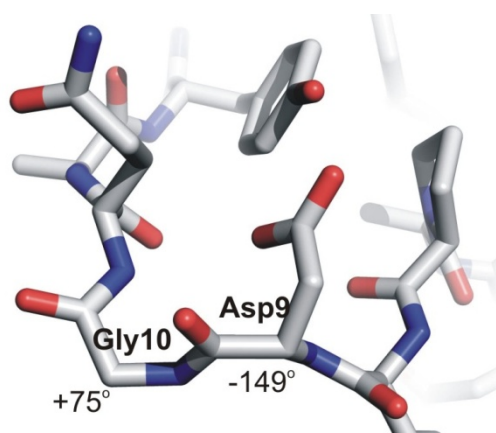


Abbildung 96 Kristallstruktur von Engel et al., Darstellung des Bereichs um Asp9-Gly10.^[143]

keinen nennenswerten Einfluss haben sollte, ersetzt werden. In Abbildung 96 ist der entsprechende Bereich um Asp9-Gly10 gezeigt, der Abstand zwischen Asp9 und Tyr13, welcher hier sehr gering erscheint, beträgt immerhin 3.5 Å und sollte daher eine zusätzliche CH₂-Gruppe tolerieren. Ein zweiter Ansatz, die Aspartimid-Bildung zu unterdrücken, bestand darin, die besonderen Gegebenheiten des in Abbildung 96 dargestellten Bereichs zu nutzen. Der ϕ -Winkel, welcher für Gly10 bestimmt wurde, betrug +75° und begünstigt daher die Substitution durch eine D-Aminosäure. Daher

bestand das Vorhaben darin, Gly10 gegen D-Ala zu ersetzen, da eine D-Aminosäuren erwartungsgemäß eine ähnliche Torsion aufweisen sollte. Dass eine Substitution von Glycin gegen D-Alanin unter Beibehaltung der biologischen Funktion möglich ist, wurde bereits durch McKinnon et al. anhand eines K⁺-Kanals gezeigt.^[155] Entsprechend der Substitution an den Positionen 17 und 18 würde damit aber auch hier die Beweglichkeit des Peptidrückgrats eingeschränkt, so dass die Faltung unter Umständen erschwert werden könnte.

4.1.2 Erste Synthesen von Foldon-Mutanten

Die Synthese der Foldon-Mutanten sollte an der Festphase unter Verwendung von 2-Cl-Tritylharz stattfinden, da sich diese Strategie in vorherigen Synthesen als sehr erfolgreich erwiesen hatte. Die

Seitenkettenschutzgruppen wurden so gewählt, dass diese unter sauren Bedingungen abgespalten werden konnten (*t*Bu-Ester, Trt, und Boc).

Seitens des Arginins fiel die Wahl auf die Pbf-Schutzgruppe für die

Guanidin-Seitenkettenfunktionalität. Pbf steht für 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl, das Guanidin ist also als

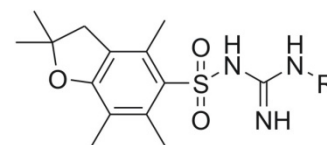


Abbildung 97 Struktur der Pbf-Schutzgruppe.

Sulfonamid geschützt (Abbildung 97). Der Vorteil der Pbf-Schutzgruppe liegt in der relativ kurzen Zeit, die für die Entschützung benötigt wird, auch wenn mehrere Pbf-geschützte Arginine vorliegen beträgt die zur Abspaltung notwendige Zeit nur etwa 2 Stunden.^[156] Alternative Arginin-Seitenkettenschutzgruppen sind beispielsweise Mtr (4-Methoxy-2,3,6-trimethylbenzenesulfonyl) und Pmc (2,2,5,7,8-Pentamethyl-chroman-6-sulfonyl), bei beiden handelt es sich ebenfalls um Sulfonamid-Schutzgruppen. Der große Nachteil dieser beiden Schutzgruppen ist jedoch die äußerst lange Dauer, welche für die Entschützung benötigt wird. So benötigt Mtr bis zu 12 Stunden und auch Pmc noch bis zu 4 Stunden für die vollständige Entschützung, sofern mehrere geschützte Arginine vorliegen.^[157]

Da alle nachfolgend aufgeführten Foldon-Mutanten identisch dargestellt wurden, soll an dieser Stelle die Synthese anhand der Verbindungen **(60)** und **(61)** repräsentativ erläutert werden. Die beiden Verbindungen [Glu⁹, Pli¹⁷=Cat¹⁸]-Foldon **(60)** und [D-Ala¹⁰, Pli¹⁷=Cat¹⁸]-Foldon **(61)** wurden jeweils in

0.2 millimolarem Maßstab mittels automatisierter Festphasensynthese dargestellt; alle weiteren nachfolgenden Verbindungen wurden in 0.1 millimolarem Maßstab synthetisiert. Für die Abspaltung wurde TFA/H₂O/TIPS/Phenol 95:2:2:1 gewählt und die Rohpeptide

wurden mittels Fällung in Diethylether isoliert. Es zeigte

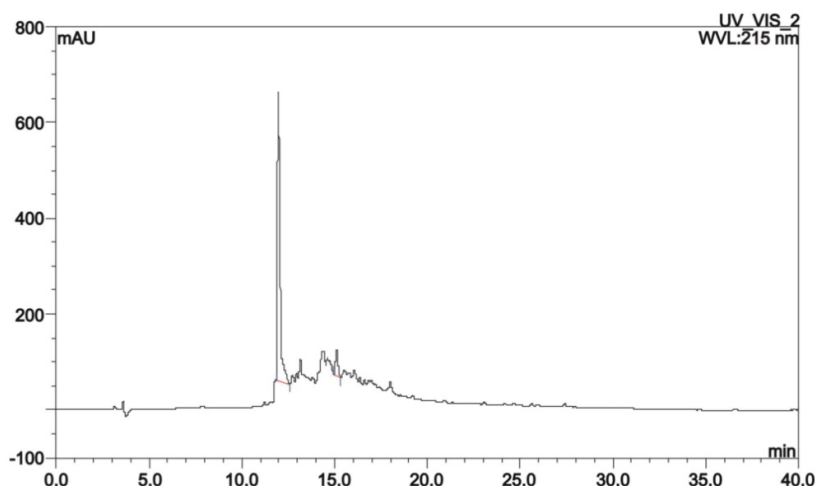


Abbildung 98 HPLC-Diagramm der Verbindung **(61)**, aufgenommen bei einer Wellenlänge von $\lambda = 215$ nm.

sich, dass bereits die unaufgereinigten Verbindungen eine sehr hohe Reinheit besaßen, dieses konnte insbesondere mittels RP-HPLC nachgewiesen werden. In Abbildung 98 ist ein HPLC-Diagramm der Verbindung **(61)** vor der Aufreinigung gezeigt, das besonders intensive Signal bei etwa 11 Minuten

kann dem gewünschten Produkt zugeordnet werden. Die Identifikation der Foldon-Derivate wurde weiterhin durch das vorhandene Tryptophan sehr erleichtert. Anhand der Absorption bei 278 nm war eine Zuordnung sehr gut möglich. Die Aufreinigung der Mutanten erfolgte mittels präparativer RP-HPLC, zwar war diese Methode recht verlustreich hinsichtlich der Ausbeuten, jedoch konnten die Verbindungen **(60)** und **(61)** in sehr hoher Reinheit gewonnen werden. Die Identifikation der Produktfraktionen erfolgte durch ein *ESI-Screening* der Fraktionen, welche der erwarteten Retention entsprachen und ein deutliches Indol-Signal aufwiesen. Durch die abschließende Lyophilisierung konnten die Peptide als gut handhabbare Feststoffe erhalten werden. Die Ausbeuten betrugen 20% für die Verbindung **(60)** sowie 15% für die Verbindung **(61)**, jeweils bezogen auf die Festphasensynthese und die anschließende Aufreinigung. Nicht einbezogen in die jeweiligen Ausbeuten sind die ebenfalls erhaltenen Mischfraktionen der jeweiligen HPLC-Läufe. Unter diesem Gesichtspunkt, genauso wie der zu berücksichtigenden Länge der Peptide von jeweils 27 Aminosäuren, sind die erhaltenen Ausbeuten sehr gut.

4.1.3 Charakterisierung der Verbindungen (60) und (61)

Die ersten NMR-spektroskopischen Untersuchungen der beiden Mutanten erfolgten in DMSO, wodurch sich schnell zeigte, dass beide eine sehr hohe Reinheit aufwiesen (Abbildung 99). Das

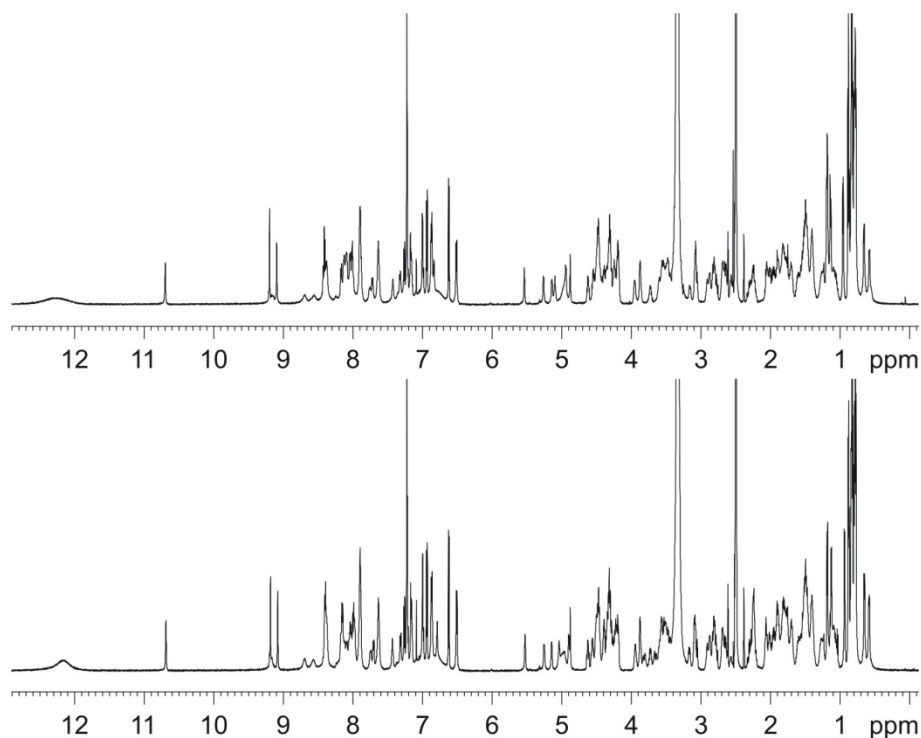


Abbildung 99 ¹H-NMR-Spektrum, 600 MHz, DMSO_{d6}. Oben: Spektrum der Asp9-D-Ala10-Mutante, unten: Spektrum der Glu9-Gly10-Mutante. Beide Spektren deuten auf eine sehr hohe Reinheit der Verbindungen hin, jedoch ist in DMSO beinahe kein Unterschied erkennbar.

Indol-NH bzw. das Brückenkopfproton des Dipeptidbausteins erschienen jeweils als einzelne Singuletts, welche keine Schulter oder ähnliche Hinweise für mögliche Verunreinigungen aufwiesen.

Das Nachteilige an den Messungen in DMSO jedoch war, dass keine Trimerisierung aufgrund der hohen koordinativen Eigenschaften des Lösungsmittels stattfinden konnte. Da beide Verbindungen als einzelne Peptidstränge vorlagen und auch die Modifikationen nur sehr geringfügig waren, konnten auch spektroskopisch fast keine Unterschiede festgestellt werden. Erstaunlich in diesem Zusammenhang war die trotz der fehlenden Trimerisierung vorliegende recht hohe Dispersion des amidischen Bereichs, dieser erstreckte sich jeweils über 2.5 ppm, das Indol-NH jeweils nicht mit einbezogen. Wahrscheinlich ist, dass eine Vorzugkonformation der monomeren Foldonstränge auch in DMSO vorliegt, es jedoch nicht zur Bildung eines Trimers kommt.

Um zu überprüfen, ob die Eigenschaft zur Ausbildung von trimeren Strukturen bei den beiden Mutanten vorlag, war es notwendig, die NMR-spektroskopischen Untersuchungen in Wasser durchzuführen. Eine erste Messung wurde in H₂O/D₂O 9:1 durchgeführt (Abbildung 100), diese zeigte deutliche Unterschiede hinsichtlich der Spektren der beiden Mutanten. Während die Glu9-Gly10-Mutante scharfe Signale zeigte, war eine deutliche Verbreiterung der Asp9-D-Ala10-Mutante zu

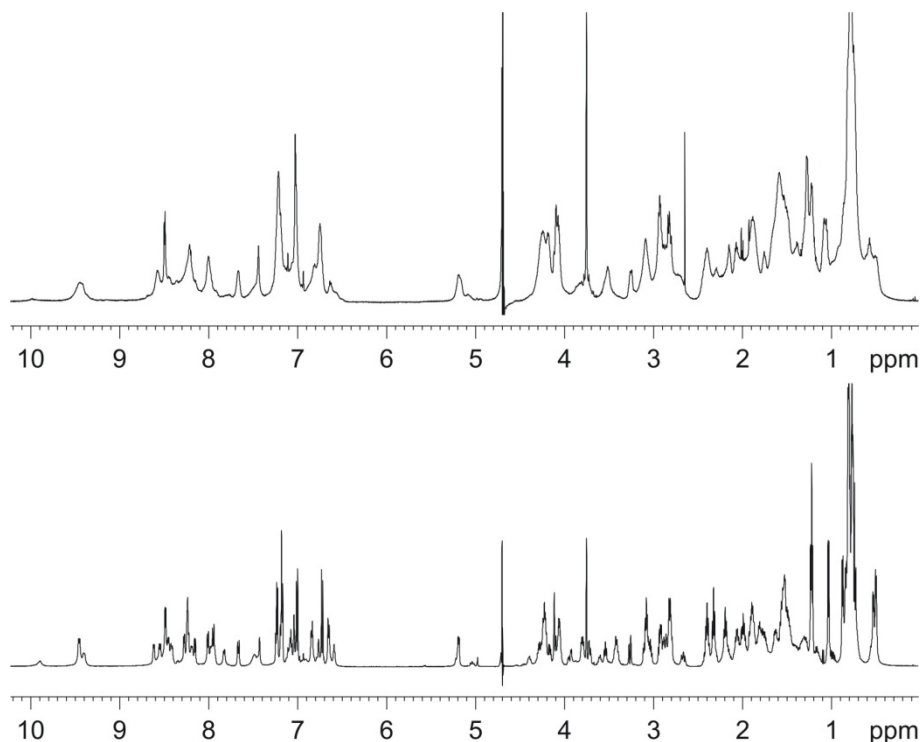


Abbildung 100 ¹H-NMR-Spektrum mit *WATERGATE* Wasserunterdrückung, 600 MHz, H₂O/D₂O 9:1. Oben: Spektrum der Asp9-D-Ala10-Mutante, unten: Spektrum der Glu9-Gly10-Mutante. Erstaunlich sind die Unterschiede der beiden Verbindungen hinsichtlich der auftretenden Verbreiterung der Asp9-D-Ala10-Mutante.

erkennen. Erstmals zeigten die beiden Verbindungen damit ein deutlich unterschiedliches Verhalten, jedoch war bei den in Abbildung 100 dargestellten Messungen der pH-Wert der Lösung noch nicht eingestellt. Die Bestimmung des pH-Wertes der wässrigen Peptidlösungen ergab, dass beide Peptide im stark sauren Milieu – etwa pH = 2 – vorlagen. Dieses war natürlich zu erwarten gewesen, da beide Peptide nach der Lyophilisierung als TFA-Salze vorlagen. Da die Proteinfaltung des Foldons stark pH-

abhängig ist, und erst ab einem Wert von etwa 4 vollständig stattfindet, musste der pH-Wert entsprechend eingestellt werden (Abbildung 101).^[140]

Die anschließenden Messungen erfolgten in 10 millimolarem Phosphatpuffer bei pH = 7, also unter Bedingungen mit niedrigem Salzgehalt, um möglichst eine Beeinflussung seitens zusätzlicher Ionen zu vermeiden. Dazu wurden die Peptide in 90% wässrigem, 10 millimolarem Phosphatpuffer und 10% D₂O gelöst. Die Kontrolle des pH-Wertes der so dargestellten Peptidlösungen ergab, dass dieser stets bei pH = 7 lag. Die unter diesen Bedingungen durchgeführten Messungen sind in Abbildung 102

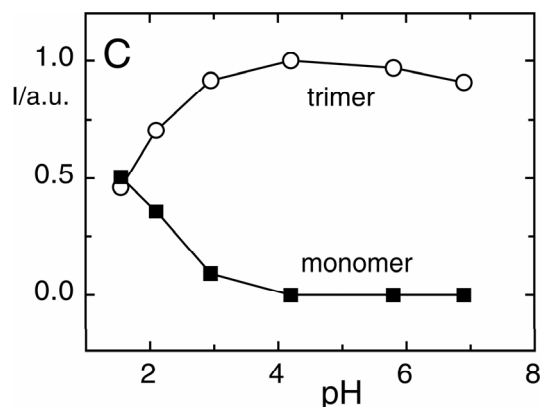


Abbildung 101 pH-Abhängigkeit der Proteinfaltung für das Wildtyp-Foldon nach [140].

gezeigt. Hier zeigen sich erstmals deutlich die Merkmale der Proteinfaltung im Spektrum der Asp9-D-Ala10-Mutante. Die starke Hochfeldverschiebung der Alkylsignale bei 0.23 und -0.26 ppm muss einer

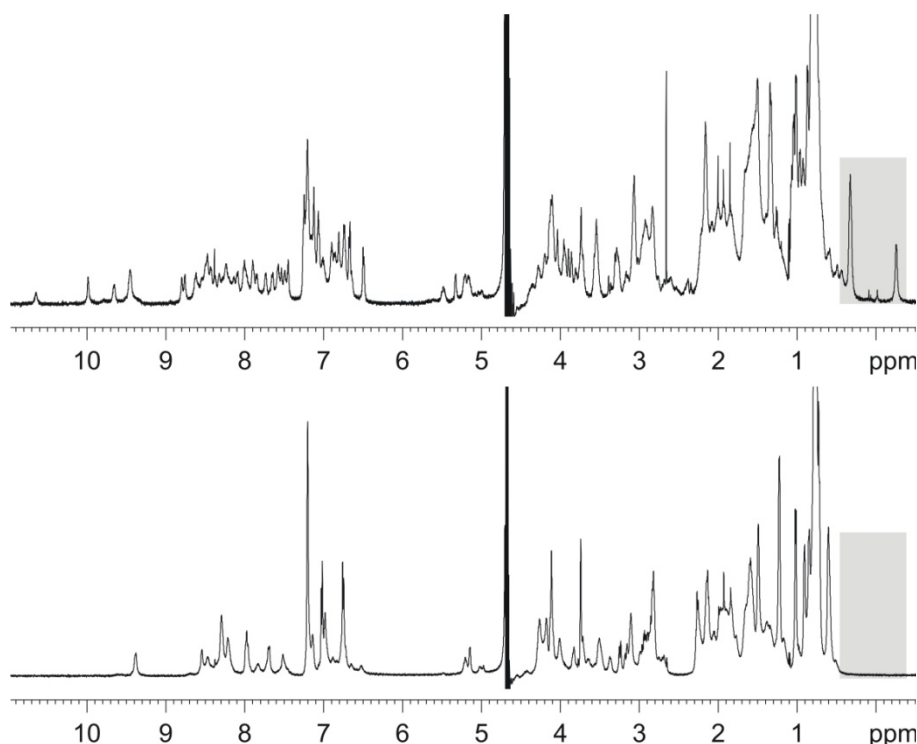


Abbildung 102 ¹H-NMR-Spektrum mit WATERGATE Wasserunterdrückung, 600 MHz, H₂O/D₂O 9:1, phosphatgepuffert pH = 7, Konzentration: 3.7 mg/mL (61) und 3.8 mg/mL (60), Temperatur 287 K. Oben: Spektrum der Asp9-D-Ala10-Mutante, unten: Spektrum der Glu9-Gly10-Mutante. Erstmals können Merkmale der Proteinfaltung beobachtet werden. Die starke Hochfeldverschiebung der Alkyle der Asp9-D-Ala10-Mutante deuten auf eine übergeordnete Struktur.

zusätzlichen Abschirmung der CH₃-Gruppen durch die Ringströme aromatischer Seitenketten zugrunde liegen. Weiterhin zeigt der amidische Bereich eine Dispersion von 4.1 ppm, diese extremen

Unterschiede seitens der Verschiebungen setzen das Vorhandensein einer definierten, übergeordneten Struktur voraus. Während sich die oben genannten Merkmale im Spektrum der Asp9-D-Ala10-Mutante deutlich herausheben, zeigt die Glu9-Gly10-Mutante kein solches Verhalten. Vielmehr erscheint das Spektrum in Abbildung 102 im Vergleich zu dem in Abbildung 100 verbreitert stark verbreitert zu sein. Der Grund hierfür liegt wahrscheinlich in der unspezifischen Aggregation der Glu9-Gly10-Mutante, während das Peptid in Abbildung 100 protoniert vorliegt. Dass mittels Protonierung Aggregation verhindert werden kann ist bekannt, durch die repulsiven Wechselwirkungen der protonierten Gruppen, zum Beispiel Ammonium- oder Guanidiniumionen, wird die unspezifische Anlagerung der Peptidketten verhindert.

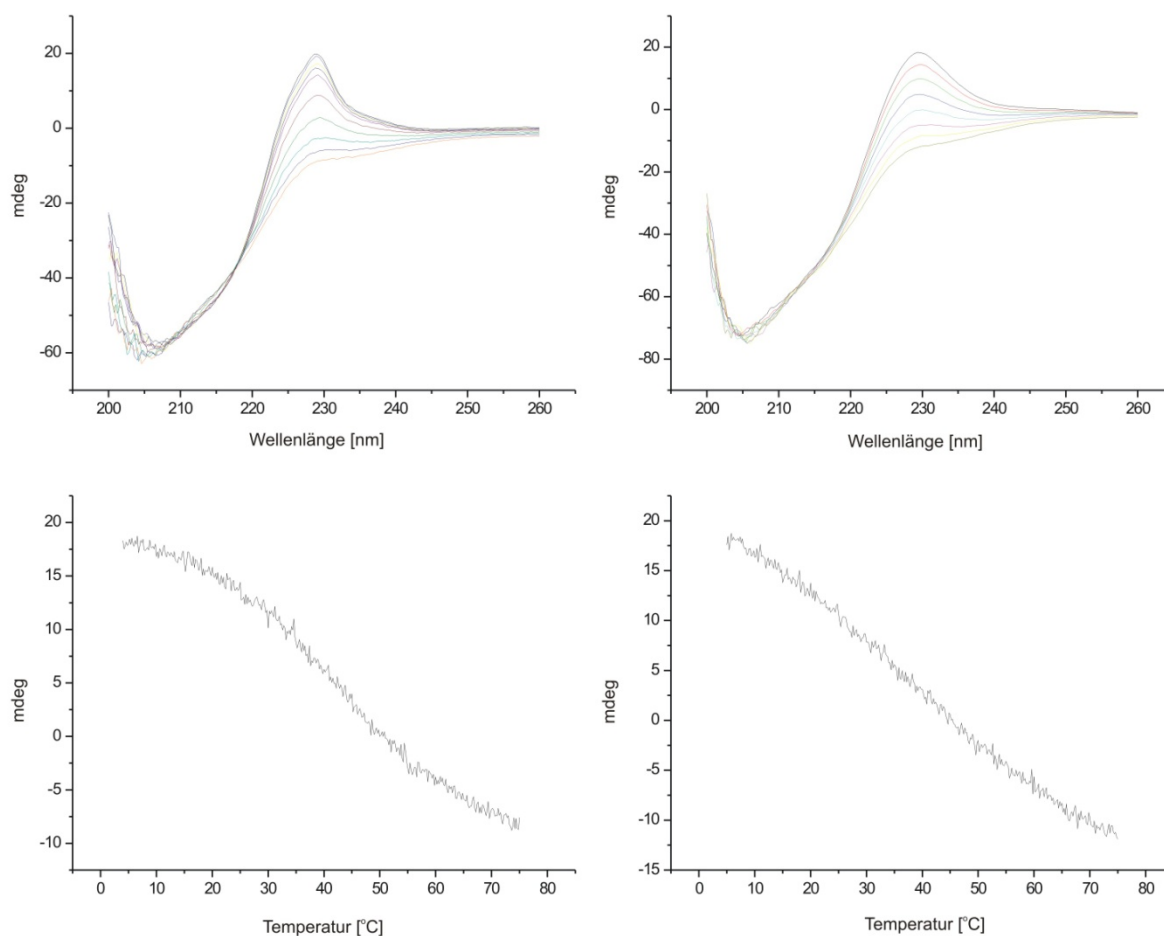


Abbildung 103 Oben: CD-Spektren der Verbindungen (61)(Asp9-D-Ala10) links und (60) (Glu9-Gly10) rechts bei 5-75 °C (in 5 °-Schritten). Die Konzentrationen betrugen 0.66 mg/mL (Asp9-D-Ala10) und 0.72 mg/mL (Glu9-Gly10) jeweils in 10 millimolaren Phosphatpuffer bei pH = 7. Unten: Verlauf des Indol-Signals bei 228 nm in Abhängigkeit von der Temperatur.

Um die ersten Erkenntnisse seitens der NMR-Spektroskopie weiter zu stützen, wurden CD-Spektren der beiden Verbindungen bei verschiedenen Temperaturen aufgenommen. Dabei wurde erwartet, dass das Entfalten bzw. das sogenannte Aufschmelzen der übergeordneten Struktur mittel CD-Spektroskopie verfolgt werden konnte. Die CD-Spektren wurden unter identischen Bedingungen entsprechend den NMR-Spektren aufgenommen, einzig die Konzentration der Peptidlösungen war

um einiges geringer, da die Messung unter NMR-Konzentrationen nicht vorteilhaft war. Die in Abbildung 103 gezeigten Spektren unterstützen die NMR-spektroskopischen Daten der Verbindungen **(60)** und **(61)**.

Die Betrachtung der CD-Spektren der Asp9-D-Ala10-Mutante (links oben) zeigt, dass unterschiedliche Abstände der einzelnen Spektren in Abhängigkeit von der jeweiligen Temperatur vorliegen. Diese Beobachtung korreliert mit dem temperaturabhängigen Verlauf des Indol-Signals bei 228 nm (links unten). Es zeigt sich der sigmoide Charakter der unteren Kurve, welcher auch die Abstände zwischen den einzelnen CD-Spektren widerspiegelt. Hingegen sind die Abstände zwischen den einzelnen CD-Messungen bei der Glu9-Gly10-Mutante konstant und der Abfall des Indol-Signals erscheint weitestgehend linear (rechts oben/unten).

Die sigmoide Abnahme eines Signals bei Temperaturerhöhung deutet auf den Zerfall einer übergeordneten Struktur hin. Dies kann damit erklärt werden, dass seitens einer Quartärstruktur streng genommen nur zwei Zustände existieren. Entweder ist das Peptid gefaltet oder es liegt in ungefalteter Form vor, dementsprechend steil sollte der Abfall der Kurve beim Überschreiten der

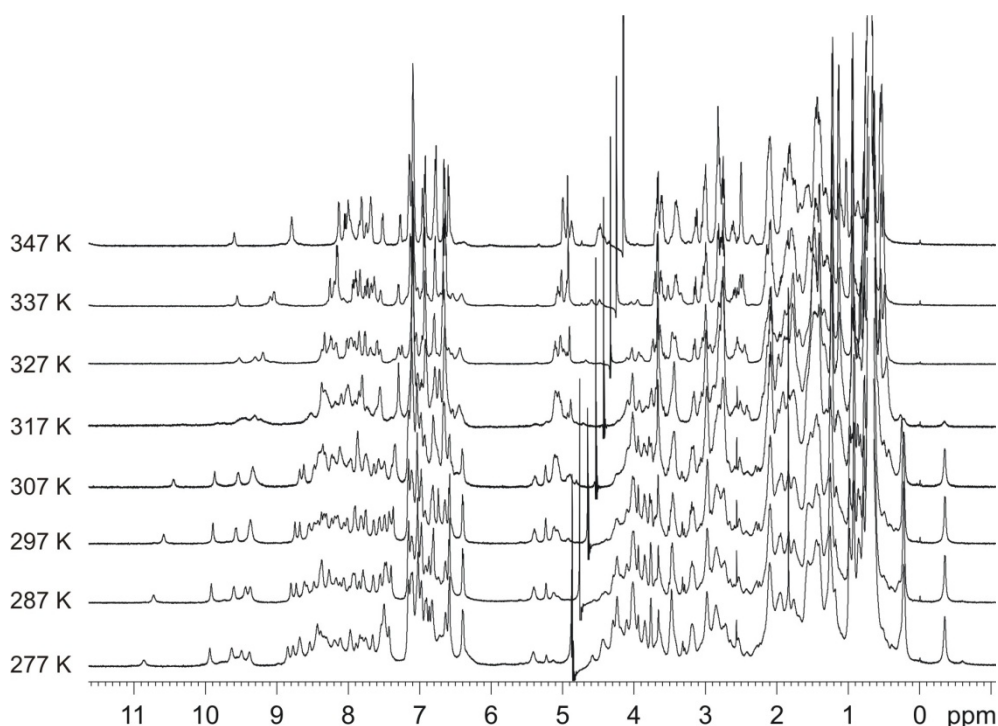


Abbildung 104 ^1H -NMR-Spektrum mit *WATERGATE* Wasserunterdrückung, 600 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, phosphatgepuffert pH = 7, Konzentration: 2.7 mg/mL. Temperaturbereich 277–347 K. Bis 307 K ist die Quartärstruktur der Verbindung **(61)** stabil, die anschließende Destabilisierung vollzieht sich innerhalb von etwa 10 K.

Schmelztemperatur sein, welche mit dem Wendepunkt korreliert.

Da der Kurvenverlauf der beiden Verbindungen in Abbildung 103 nicht besonders ausgeprägt war, erschien die Verwendung der CD-Spektroskopie als nicht geeignet, um genauere Aussagen hinsichtlich der Entfaltung der Foldone treffen zu können. Daher wurde mittels NMR-Spektroskopie versucht, den Faltungsprozess nachzuvollziehen. Ähnlich vorheriger Messungen zur Bestimmung der

Temperaturgradienten wurden für Verbindung **(61)** ^1H -NMR-Spektren bei unterschiedlicher Temperaturen aufgenommen. In Abbildung 104 sind die entsprechenden Spektren der Verbindung **(61)** im Temperaturbereich von 277-347 K dargestellt. Es zeigt sich deutlich die Quartärstruktur und deren Stabilität bis 307 K, sowie der anschließende rapide Abfall der Signalintensität der hochfeldverschobenen Signale. Genauso zeigt der Amidbereich bis 307 K eine deutliche Dispersion, die dann sehr schnell in sich zusammenfällt. Bei 317 K sind noch geringe Mengen des gefalteten Proteins detektierbar, ab 327 K ist die Verbindung vollständig entfaltet.

Dieses Verhalten entspricht exakt dem mittels CD-Spektroskopie beobachteten, nur dass der Übergang zwischen ge- und entfaltetem Protein in den NMR-Spektren sehr viel schärfer definiert ist. Während der Übergang in Abbildung 103 sich sehr langsam zu vollziehen scheint, ist die Entfaltung des gleichen Proteins im NMR innerhalb eines Temperaturbereichs von etwa 10 K abgeschlossen. Weiterhin besteht die Möglichkeit, NMR-spektroskopisch den Verlauf einzelner Signale zu verfolgen, während sich im CD-Spektrum nur die Summe aller beobachteten Signale widerspiegelt.

Eine Korrelation der Schmelztemperatur aus den CD- und NMR-Spektren deutet eine Übereinstimmung der erhaltenen Werte an, da die CD-Spektren aber nicht eindeutig interpretierbar waren, sind die Ergebnisse unter Vorbehalt zu betrachten. So ergibt sich seitens der CD-Spektroskopie eine Temperatur von etwa 313 K, der geschätzte Wert hinsichtlich der NMR-Spektren liegt bei etwa 312 K.

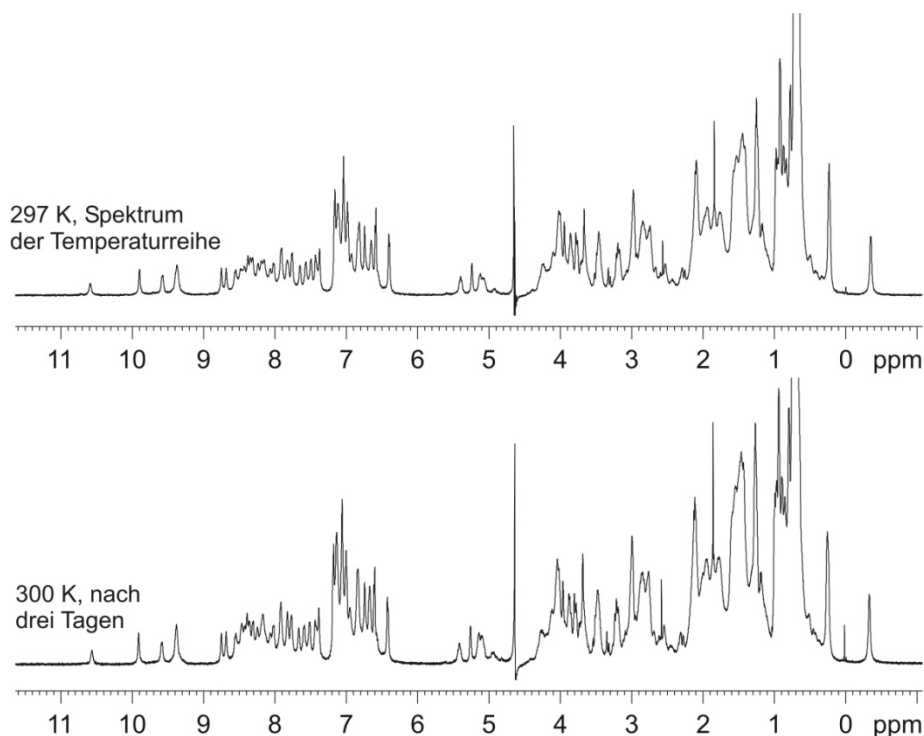


Abbildung 105 ^1H -NMR-Spektren mit *WATERGATE* Wasserunterdrückung, 600 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, phosphatgepuffert pH = 7, Konzentration: 2.7 mg/mL. Gezeigt sind die Spektren der Verbindung **(61)**, das Obere entstammt der Temperaturreihe, das Untere wurde drei Tage später aufgenommen.

erlangen; nach einigen Versuchen gelang dies letztlich. Die ausführliche Diskussion der Kristallstruktur soll an späterer Stelle (Kapitel 4.5) durchgeführt werden, es zeigte sich jedoch, dass alle bis zu diesem Zeitpunkt, auf der Basis der spektroskopischen Daten, getroffenen Aussagen mit denen der Kristallstrukturdaten vollkommen übereinstimmten.

4.1.4 Versuche zur Stabilisierung der Glu9-Gly10-Mutante

4.1.4.1 N-terminale Collagen-Mutanten

Da die Substitution von Asp9 gegen Glu die Faltung der Mutante nicht mehr zuließ, lag dadurch erstmals eine monomere Foldon-Mutante vor. Anhand dieser sollte im Weiteren versucht werden, durch zusätzliche Substitutionen die Faltung erneut zu ermöglichen. Dieses erschien seitens der Glu9-Gly10-Mutante besonders interessant, da eine erneute Stabilisierung der Mutante sehr deutlich erkennbar wäre. Eine Möglichkeit zu Stabilisierung bestand darin, das Foldon durch Anknüpfen einer weiteren Einheit, welche ebenfalls zur Trimerisierung neigt, hinsichtlich der Faltung zu unterstützen. Dazu wurde der Ansatz von *Engel et al.* verwendet, ein Collagen-Strang am N-Terminus des Foldons anzubinden.^[143] Allerdings sollten die Foldon-Derivate nicht durch Ligation eines biochemisch exprimierten Collagens an das bestehende Foldon, sondern mittels Festphasensynthese linear aufgebaut werden. Dadurch war es sehr viel einfacher, die Länge des Collagens gezielt zu verändern, weiterhin war es festphasensynthetisch möglich, anstelle von $(\text{Pro-Pro-Gly})_n$ $(\text{Pro-Hyp-Gly})_n$ zu verwenden. Die Verwendung von Hydroxyprolin war in diesem Zusammenhang von großem Vorteil, da Hydroxyprolin-enhaltende Collagene eine deutlich höhere Stabilität aufweisen.^[158] Durch den direkten Vergleich von $(\text{Pro-Pro-Gly})_{10}$ und $(\text{Pro-Hyp-Gly})_{10}$ konnte eine Differenz seitens der Schmelztemperatur von 28 °C, ausschließlich bedingt durch die Substitution von Prolin gegen Hydroxyprolin, beobachtet werden.^[159] Begründet werden kann dies durch zwei Ansätze, zum einen können die freien Hydroxylgruppen zusätzliche, stabilisierende Wasserstoffbrücken aufbauen. Zum anderen wird durch die Elektronegativität der Hydroxylgruppe das *Puckering* des Prolins derart verändert, dass eine Stabilisierung der Tripelhelix stattfindet.^[160-162]

Es wurden drei verschiedenen Foldon-Mutanten dargestellt, die unterschiedlich lange Collagene enthielten. Hierbei wurden eine, zwei und fünf Wiederholungseinheiten der Sequenz Pro-Hyp-Gly, welche im Weiteren als PUG bezeichnet werden soll, auf den N-Terminus gekuppelt. Da die letzte N-terminale Aminosäure des Foldons ohnehin Glycin war, wurde das erste Glycin der PUG-Einheit jeweils ausgelassen. Für den Fall, dass eine stabilisierende Auswirkung hinsichtlich der Foldone bestehen würde, wäre durch die Wahl der vorliegenden Anzahl der PUG-Einheiten der zur Stabilisierung notwendige Beitrag einfach abzuschätzen.

Die NMR-spektroskopische Untersuchung der Foldon-Derivate [Pro⁻², Hyp⁻¹, Glu⁹, Pli¹⁷=Cat¹⁸]-Foldon (**62**), [Pro^{-2,-5}, Hyp^{-1,-4}, Gly⁻³, Glu⁹, Pli¹⁷=Cat¹⁸]-Foldon (**63**) und [Pro^{-2,-5,-8,-11,-14}, Hyp^{-1,-4,-7,-10,-13}, Gly^{-3,-6,-9,-12}, Glu⁹, Pli¹⁷=Cat¹⁸]-Foldon (**64**) erfolgte jeweils bei 287 K, damit gegebenenfalls auch schwache Faltungen beobachtet werden konnten. Höhere Temperaturen hätten das Risiko mit sich gebracht, dass die gewählte Messtemperatur bereits über dem Schmelzpunkt des Proteins hätte liegen

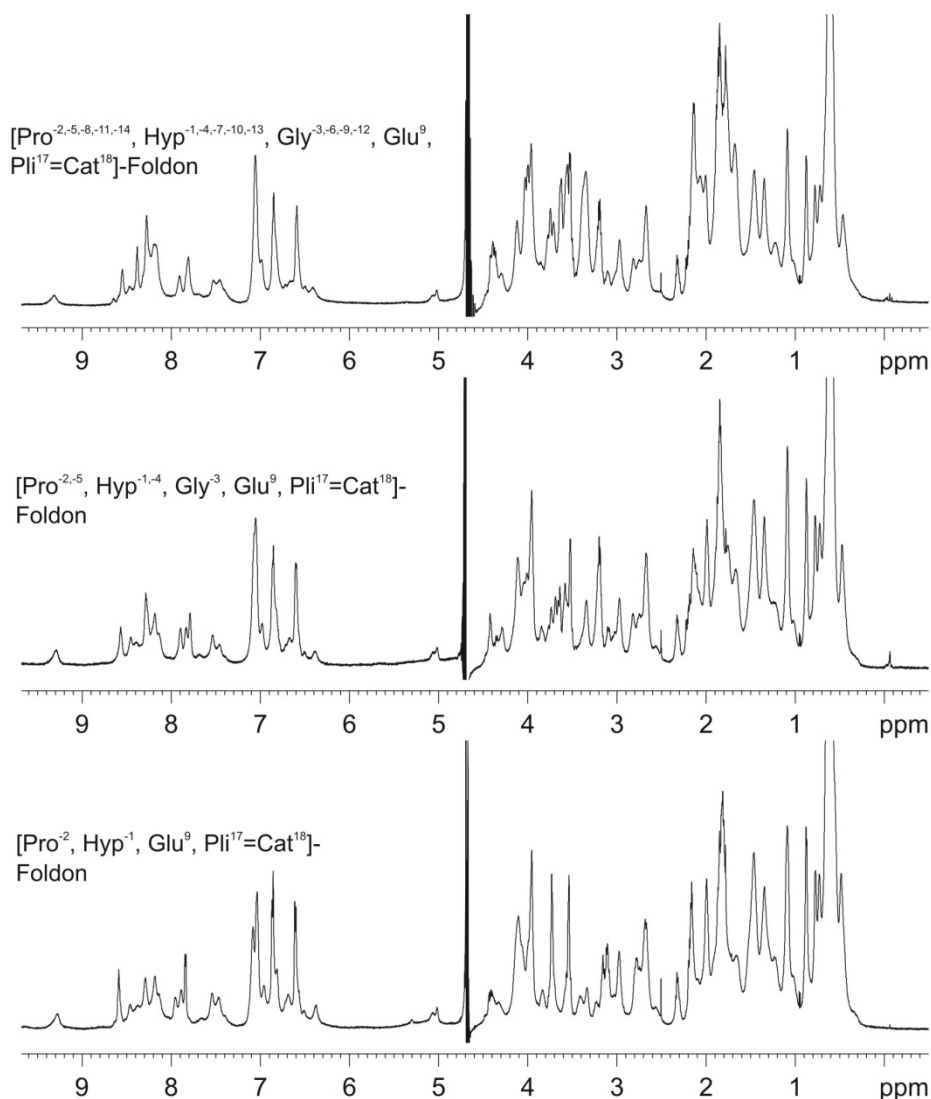


Abbildung 107 ¹H-NMR-Spektrum mit *WATERGATE* Wasserunterdrückung, 600 MHz, H₂O/D₂O 9:1, phosphatgepuffert pH = 7, Konzentration 4.3 mg/mL (**64**), 3.6 mg/mL (**63**) und 5.5 mg/mL (**62**), Temperatur 287 K. Es zeigt sich, dass keine der Foldon-Mutanten in der Lage ist zu falten.

können. In Abbildung 107 sind die entsprechenden Spektren gezeigt, dort zeigt sich sehr deutlich am Fehlen der hochfeldverschobenen Alkylsignale, dass keine der vorliegenden Verbindungen in der Lage war, ein Trimer auszubilden.

4.1.4.2 Stabilisierung der α -Helix durch weitere Dipeptidbausteine

Am Beispiel der Dipeptid-Oligomere konnte gezeigt werden, dass diese in der Lage sind helikale Strukturen auszubilden. Eine interessante Fragestellung war, ob die Verwendung von Pli=Cat im

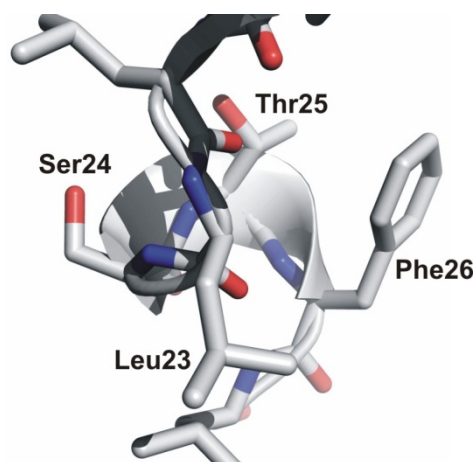


Abbildung 108 Ausschnitt aus der Kristallstruktur von Engel et al. Der Bereich der α -Helix mit den entsprechenden Aminosäuren ist hervorgehoben.^[143]

α -helikalen Bereich des Foldons zu einer Stabilisierung der Gesamtstruktur, durch einen zusätzlichen Beitrag des Dipeptidmimetikums zur Stabilität der Helix, führen würde.

In Abbildung 108 ist der α -helikale Bereich des Foldons gezeigt, Ziel war es, die ersten und letzten beiden Aminosäuren der Helix jeweils durch Pli=Cat zu ersetzen.

Die beiden Mutanten [Glu⁹, Pli^{17,23}=Cat^{18,24}]-Foldon (**65**) und [Glu⁹, Pli^{17,25}=Cat^{18,26}]-Foldon (**66**) wurden in guten Ausbeuten von 17% bzw. 12% dargestellt. Die NMR-

spektroskopische Untersuchung erfolgte auch bei diesen beiden Mutanten bei 287 K, um eine eventuelle Faltung zu begünstigen. Es zeigt sich jedoch, dass auch diese Modifikation des Foldons nicht zur Stabilisierung eines Trimers führte. Beide Verbindungen zeigten eine recht geringe Dispersion im amidischen Bereich und keine Hochfeldverschiebung der Methylsignale unter 0.5 ppm. Allerdings zeigte sich, dass die Substitution von Thr25-Phe26 gegen Pli=Cat zu einer erheblichen Verbreiterung des Spektrums in Vergleich zur Leu23-Ser24 substituierten Mutante führte.

Auch wenn keine der Modifikationen, weder die Einführung eines Collagens noch die Substitutionen an der α -Helix, zu einer faltenden Glu9-Gly10-Mutante führte, wurden doch einige sehr aufschlussreiche Verbindungen erhalten. So konnte auf synthetischer Seite gezeigt werden, dass die Darstellung eines Peptids (**62**) aus 41 Aminosäuren mit einer Ausbeute von immerhin 6%, bezogen auf Festphasensynthese und Aufreinigung, möglich war.

Das Scheitern der Versuche zu Stabilisierung kann auf zwei mögliche Gründe zurückgeführt werden. Zum einen ist es möglich, dass die Glu9-Gly10 Modifikation einen derart gravierenden Eingriff in die Struktur des Foldons darstellte, dass eine Trimerisierung unter keinen Umständen erneut stattfinden konnte. Zum anderen besteht auch die Möglichkeit, dass die Modifikationen letztlich zu einer weiteren Destabilisierung der Struktur geführt haben. Seitens des Collagens wäre auch möglich, dass die notwendige Länge des Collagens zur Stabilisierung noch nicht erreicht worden war bzw. das Fehlen eines Linkers, wie er von Engel et al. verwendet wurde, das Ausbilden einer Tripelhelix nicht erlaubte.

4.1.5 Überprüfung der Modifikationen seitens der Asp9-D-Ala10-Foldone

Da kein Zugang zu einer faltenden Glu9-Gly10-Mutante möglich erschien, und sich die Asp9-D-Ala10-Modifikation bereits als sehr erfolgversprechend gezeigt hatte, wurden von diesem Foldon-Derivat im Weiteren zusätzliche Mutanten dargestellt.

4.1.5.1 Verwendung des Collagens zur Stabilisierung der Asp9-D-Ala10-Mutante

Die Einführung eines Collagens hatte keinen verbessernden Einfluss auf die fehlende Trimerisierungsneigung des Glu9-Gly10-Foldons. Um zu überprüfen, ob eine Auswirkung hinsichtlich eines Foldons beobachtet werden konnte, das in der Lage war zu falten, sollte die Synthese des [Pro^{-2,-5,-8,-11,-14}, Hyp^{-1,-4,-7,-10,-13}, Gly^{-3,-6,-9,-12}, D-Ala¹⁰, Pli¹⁷=Cat¹⁸]-Foldons (**67**) erfolgen. Die Ausbeute für Verbindung (**67**) betrug 6% und entsprach damit exakt der Ausbeute der anlogen Glu9-Gly10-Variante. Das ¹H-NMR-Spektrum ist in Abbildung 109 gezeigt. Auffällig ist hier das

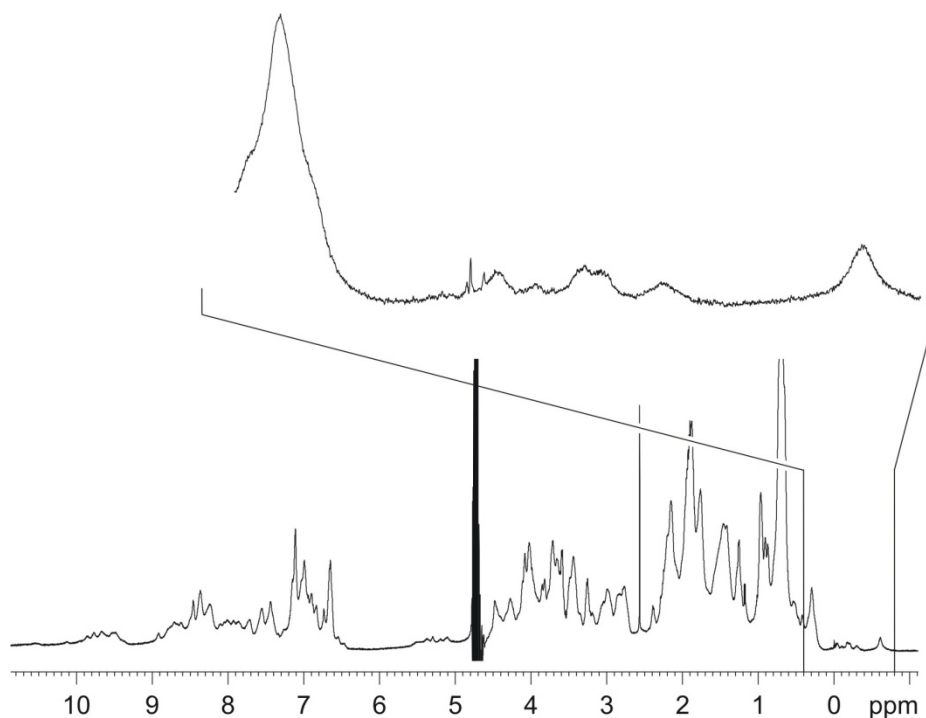


Abbildung 109 ¹H-NMR-Spektrum mit WATERGATE Wasserunterdrückung, 600 MHz, H₂O/D₂O 9:1, phosphatgepuffert pH = 7, Konzentration 6.3 mg/mL (**67**), Temperatur 287 K. Die Spreizung des Hochfeldbereichs zeigt recht deutlich eine Vielzahl von stark verschobenen Alkylsignalen.

Vorhandensein einiger stark hochfeld-verschobener Alkylsignale. Da eine Collagen-Tripelhelix aus drei Einzelsträngen besteht, die jeweils um eine Aminosäure gegeneinander versetzt sind, erklärt sich das in Abbildung 109 dargestellte Spektrum. Die trimerisierte Foldon-Mutante bildet ein festes Grundgerüst, auf dem aufbauend sich die Tripelhelix ausbildet. Damit dies geschehen kann, müssen die einzelnen Collagen-Stränge jeweils um eine Aminosäure gegeneinander verschoben sein, was nur durch ein Verschieben der Collagene gegeneinander erreicht werden kann. Dadurch resultiert ein Verkippen der Tripelhelix gegenüber der C₃-Achse des Foldons. Die dreizählige Schraubenachse der

PPII-Helix und die C₃-Achse des Foldons können dementsprechend nicht so angeordnet werden, dass diese zur Deckung gebracht werden können.

Exakt das gleiche Verhalten kann in der Kristallstruktur des Foldon-Derivats von Engel et al. beobachtet werden (Abbildung 110).^[143] Durch das Verkippen des Collagens wird die C₃-Symmetrie des Foldons aufgehoben. Damit verbunden ist die Abnahme der Signale um 2/3 der ursprünglichen Intensität des C₃-symmetrischen Trimers, wodurch auch die relativ schlechte Auflösung des in Abbildung 109 gezeigten ¹H-NMR-Spektrums, trotz der hohen Proteinkonzentration von 6.3 mg/mL, erklärt wird.

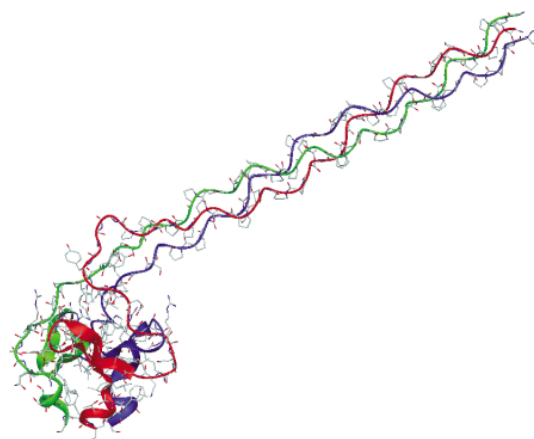


Abbildung 110 Kristallstruktur der gesamten Foldon-Mutante von Engel et al.^[143]

Die Messung von ¹H-NMR-Spektren bei verschiedenen Temperaturen lieferte sehr aufschlussreiche Daten, die Überlagerung der Spektren des interessanten Temperaturbereichs ist in Abbildung 111 dargestellt. Die Spektren zeigen zum einen, dass das Methylsignal bei -0.45 ppm bis 287 K anzuwachsen scheint und weiterhin, dass dem Aufschmelzen des Trimers eine Verbreiterung der

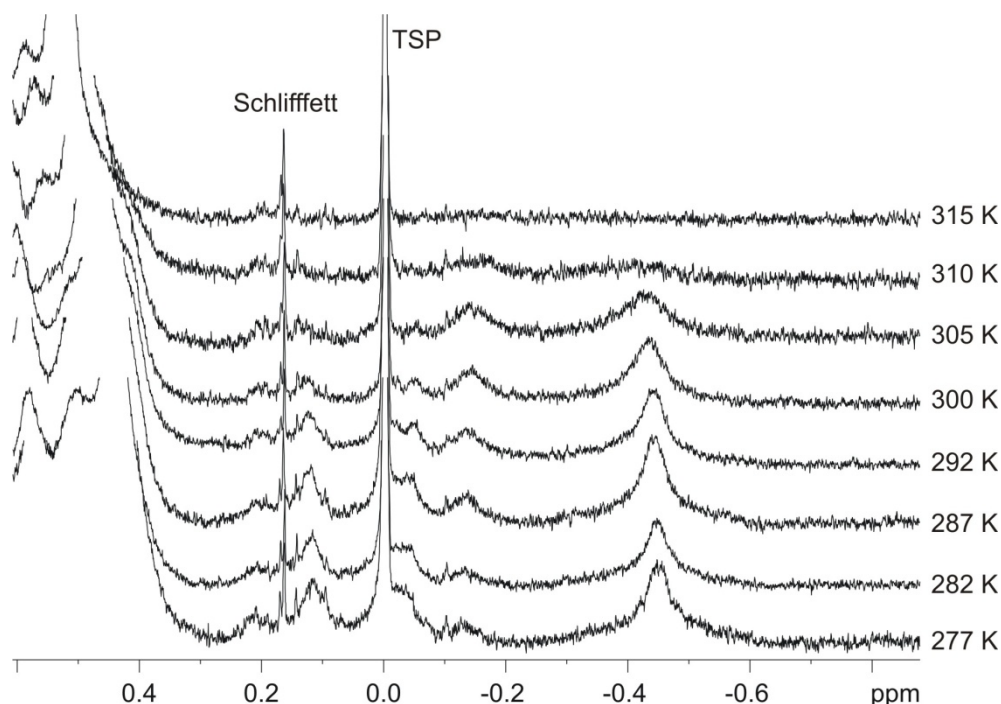


Abbildung 111 ¹H-NMR-Spektren mit WATERGATE Wasserunterdrückung, 600 MHz, H₂O/D₂O 9:1, phosphatgepuffert pH = 7, Konzentration: 3.8 mg/mL. Temperaturbereich 277-315 K. Es zeigt sich, dass dem Aufschmelzen der Verbindung (67) eine starke Verbreiterung vorausgeht. Außerdem scheint das Signal bei -0.45 ppm bis 287 K intensiver zu werden.

Signale vorausgeht. Dieses Verhalten kann dahin gehend gedeutet werden, dass im Zuge der Temperaturerhöhung die Besetzung einer bevorzugten Struktur zunimmt, welche unter weiterem Ansteigen der Temperatur aufschmilzt. Die Wechselwirkung zwischen Collagen und Foldon scheint

jedenfalls die stärkere Hochfeldverschiebung des Alkylsignals bei -0.55 ppm zu bedingen, im Vergleich dazu beträgt die maximale Verschiebung in der Mutante ohne Collagen -0.18 ppm. Wird die maximale Verschiebung mit einer erhöhten Strukturbildung gleichgesetzt, so deutet dieses Kriterium auch einen stabilisierenden Einfluss seitens des Collagens an. Damit verbunden wäre das Fehlen einer Stabilisierung der Glu9-Gly10-Mutante seitens des Collagens darauf zurückzuführen, dass bei dieser Mutante die Möglichkeit zur Trimerisierung grundsätzlich nicht gegeben war.

4.1.5.2 Substitutionen im α -helikalen Bereich der Asp9-D-Ala10-Mutante

Da sich die Vermutung zu bestätigen schien, dass durch die Einführung eines Collagens eine Stabilisierung hervorgerufen werden konnte, sollten auch die weiteren Modifikation, die an der Glu9-Gly10-Mutante durchgeführt worden waren, am Asp9-D-Ala10-Foldon überprüft werden. Dazu

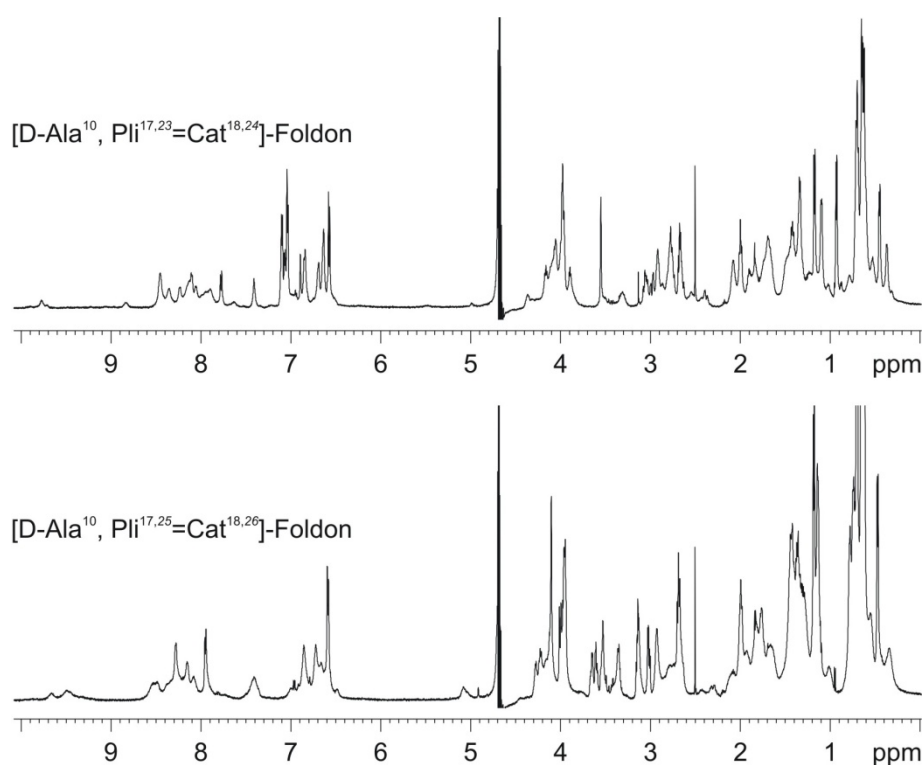


Abbildung 112 ^1H -NMR-Spektrum mit WATERGATE Wasserunterdrückung, 600 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, phosphatgepuffert pH = 7, Konzentration 3.1 mg/mL (68) und 2.4 mg/mL (69), Temperatur 287 K. Keine der beiden Mutanten zeigt eine kooperative Faltung, was die Vermutung stützt, dass eine Modifikation der α -Helix seitens der Trimerisierung kontraproduktiv ist.

wurden erneut die Aminosäuren Leu23-Ser24 und Thr25-Phe26 durch Pli=Cat substituiert. Die ^1H -NMR-Spektren der Verbindungen $[\text{D-Ala}^{10}, \text{Pli}^{17,23}=\text{Cat}^{18,24}]$ -Foldon (68) und $[\text{D-Ala}^{10}, \text{Pli}^{17,25}=\text{Cat}^{18,26}]$ -Foldon (69) sind in Abbildung 112 dargestellt. Keine der beiden Mutanten scheint mehr in der Lage zu sein, eine Faltung einzugehen. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass die Modifikation der α -Helix nicht zu einer Stabilisierung führt. Fraglich in diesem Zusammenhang ist, ob die durch Pli=Cat vorgegebenen Torsionswinkel oder sterische Wechselwirkungen für die Destabilisierung verantwortlich sind. Jedenfalls konnte somit gezeigt werden, dass auch dem α -helikalen Bereich des

Foldons eine hohe Bedeutung seitens der Proteinfaltung zukommt und dieser eine Substitution durch den Dipeptidbaustein nicht toleriert.

In Analogie zu den entsprechenden Glu9-Gly10-Mutanten resultiert auch im Fall der vorliegenden Foldone eine deutliche Verbreiterung des Spektrums aus der Substitution von Thr25-Phe26 gegen Pli=Cat. Eine mögliche Begründung hierfür könnte sein, dass durch das Fehlen dieser Aminosäuren der α -helikale Bereich vollständig zusammenbricht und dass das Fehlen dieses Strukturelements das Auftreten einer unspezifischen Aggregation begünstigt.

4.1.6 Modifikationen des PPII-helikalen Bereichs durch zusätzliche Dipeptidbausteine als Prolin-Analoga

Seitens des PPII-helikalen-Bereichs erschien die Fragestellung nach den Auswirkungen hinsichtlich der Substitution durch Pli=Cat sehr interessant. Da die Modifikationen der α -Helix zur vollständigen Entfaltung führten, sollte so überprüft werden, ob ein helikaler Bereich mit anderen Torsionswinkeln

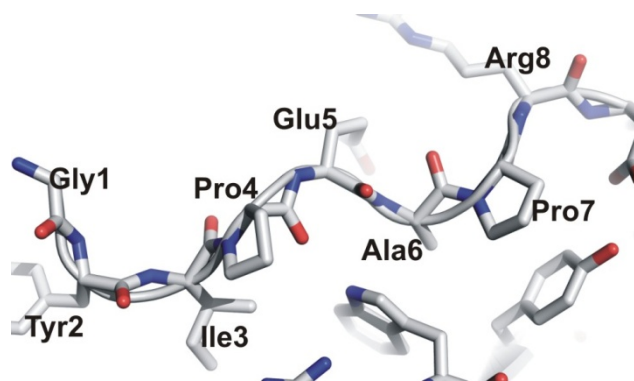


Abbildung 113 Darstellung des PPII-helikalen Bereichs des Foldons, entsprechend vorheriger Abbildungen der Kristallstruktur von Engel et al. entnommen.^[143]

durch eine Substitution mittels Pli=Cat ebenfalls destabilisiert würde. Erwartungsgemäß sollten Substitutionen im PPII-helikalen-Bereich zu erheblichen Störungen führen, da die Konformation von Pli=Cat nicht die notwendigen Anforderungen erfüllt. Für den passenden Einbau in eine PPII-Helix wäre eine gestreckte Konformation des Dipeptidbausteins notwendig, wie sie zum Beispiel von anderen Thiazolidinlactamen der

Arbeitsgruppe Geyer eingenommen wird.^[56] Trotzdem sollte Pli=Cat an dieser Stelle verwendet werden, da das Fehlen einer Trimerisierung auch einen indirekten Beweis für das U-Motiv des Dipeptidbausteins darstellen würde. Die PPII-Helix erschien zusätzlich aufgrund der Proline interessant, da das Thiaprolin des Pli=Cats als Prolinisoster eingesetzt werden konnte (Abbildung 113). Daher sollten zum einen die Aminosäuren Ile3-Pro4 sowie Ala6-Pro7 jeweils durch Pli=Cat ersetzt werden.

Die Verbindungen [D-Ala¹⁰, Pli^{3,17}=Cat^{4,18}]-Foldon (**70**) und [D-Ala¹⁰, Pli^{6,17}=Cat^{7,18}]-Foldon (**71**) konnten in guten Ausbeuten von 21% bzw. 20% synthetisiert werden. Die NMR-spektroskopische Untersuchung zeigte, dass erstaunlicherweise das [D-Ala¹⁰, Pli^{3,17}=Cat^{4,18}]-Foldon teilweise ein Trimer bildete, während das [D-Ala¹⁰, Pli^{6,17}=Cat^{7,18}]-Foldon entsprechend den Erwartungen keine Faltung zeigte. Die Spektren der beiden Verbindungen sind in Abbildung 114 gezeigt, die schwache Ausprägung seitens der Trimerisierung von Verbindung (**70**) zeigt sich zum einen an der geringen

Intensität der hochfeldigen Signale, zum anderen an der niedrigen Hochfeldverschiebung von -0.01 ppm.

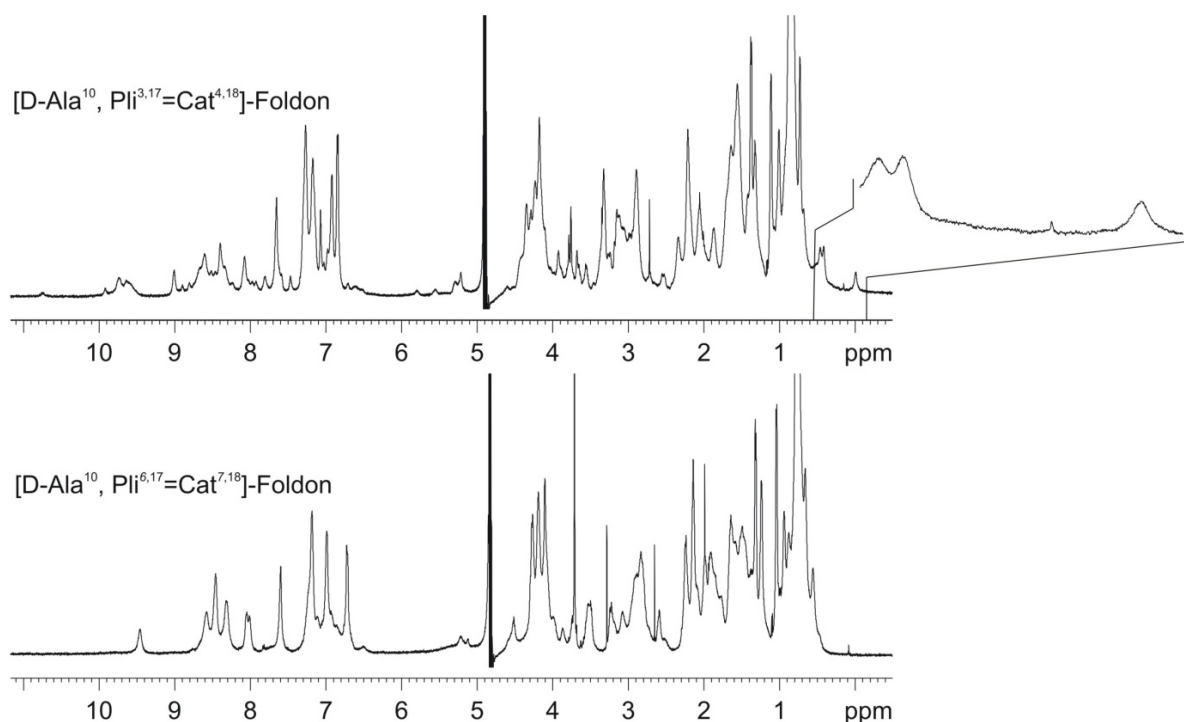


Abbildung 114 ^1H -NMR-Spektrum mit *WATERGATE* Wasserunterdrückung, 600 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, phosphatgepuffert pH = 7, Konzentration 3.0 mg/mL (70) und 2.9 mg/mL (71), Temperatur 287 K. Nur die Verbindung (70) zeigt eine Faltung zum Trimer.

Die Erklärung für die Trimerisierung der Ile3-Pro4 substituierten Mutante wird weniger darin begründet sein, dass Pli=Cat das Strukturmotiv einer PPII-Helix nachahmen kann, als vielmehr, dass Mutationen am N-Terminus wahrscheinlicher toleriert werden. Gestützt wird diese Vermutung dadurch, dass die zweite Substitution in der PPII-Helix zur Entfaltung führt, was ein deutliches Zeichen für eine Konformation ist, die nicht die Anforderungen einer PPII-Helix erfüllt.

Durch die beiden Mutationen an Ile3-Pro4 bzw. Ala6-Pro7 kann somit auch ein Bereich seitens der Veränderung des Foldons bestimmt werden, in dessen Rahmen eine Faltung noch stattfinden kann. Wahrscheinlich ist, dass die ersten vier Aminosäuren keinen obligatorischen Einfluss hinsichtlich der Trimerisierung besitzen, wodurch nicht ausgeschlossen werden soll, dass Mutationen in diesem Bereich nicht zu einer Verminderung der Stabilität führen.

4.1.7 Synthese und Charakterisierung N-substituierter Asp9-D-Ala10 Foldone

Unter der Annahme einer besonders hohen Stabilität der N-terminalen Domäne und der damit verbundenen Möglichkeit zur Mutation in diesem Bereich sollten einige Foldon-Derivate dargestellt werden.

4.1.8 Substitutionen von Tyr2 gegen andere Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten

Das NMR-Modell des Foldons von *Kiefhaber et al.* zeigt deutlich die räumliche Anordnung der Tyrosine an Position 2 im Trimer. Diese sind jeweils leicht gegeneinander verkippt und bilden eine aromatische Oberfläche im gefalteten Foldon (Abbildung 115). Diesbezüglich ergaben sich zwei interessante Fragestellungen. Zum einen, ob es möglich sei, durch die Verwendung größerer aromatischer Seitenketten die hydrophoben/aromatischen Wechselwirkungen zu verstärken. Und zum anderen ob es möglich sei, eine zusätzliche Funktionalität in das Foldon einzubringen, welche letztlich aufgrund der Ausrichtung mehrfach in Wechselwirkung treten könnte. Zum Einführen einer größeren aromatischen Seitenkette sollte anstelle des Tyr2

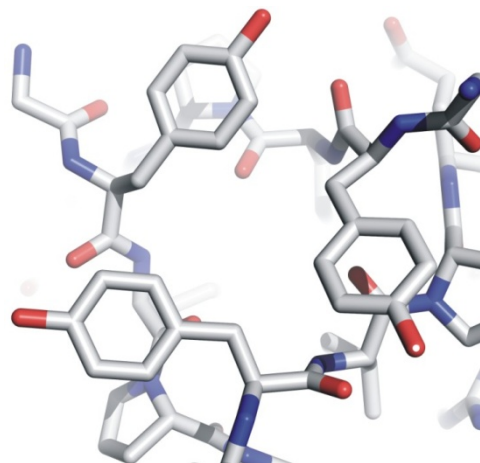


Abbildung 115 NMR-Modell der Anordnung der drei Tyr2 im gefalteten Foldon nach *Kiefhaber et al.*^[141]

2-Naphthylalanin verwendet werden. In der Festphasensynthese wurde Boc-2-Nal eingesetzt, aufgrund der Boc-Schutzgruppe konnte daher die letzte Kupplung von Gly1 nicht mehr erfolgen, da ein Abspalten der Boc-Schutzgruppe am Harz nicht möglich war. Entsprechend den Erwartungen

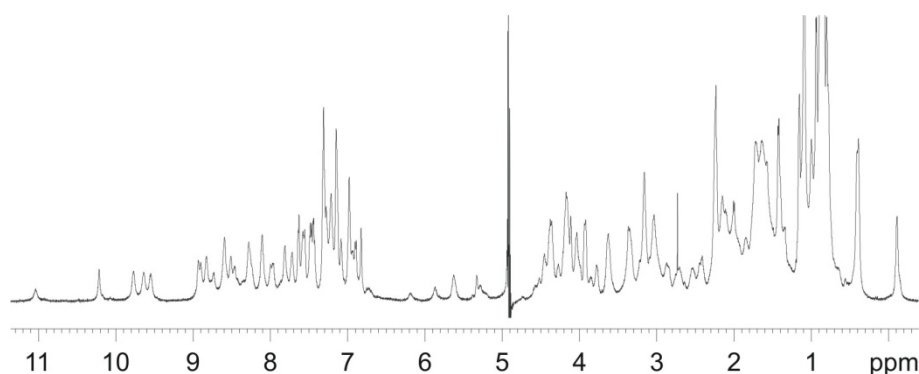


Abbildung 116 ^1H -NMR-Spektrum mit WATERGATE Wasserunterdrückung, 600 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, phosphatgepuffert pH = 7, Konzentration 3.7 mg/mL (**72**), Temperatur 287 K. Sehr deutlich zeigt sich die Hochfeldverschiebung der Alkylsignale.

sollte das Fehlen des Glycins jedoch keinen merklichen Einfluss auf die Trimerisierung besitzen. Die Synthese von $[\Delta\text{Gly}^1, 2\text{-Nal}^2, \text{D-Ala}^{10}, \text{Pli}^{17}=\text{Cat}^{18}]$ -Foldon (**72**) gelang mit einer Ausbeute von 13% bezogen auf Festphasensynthese und Aufreinigung. Durch die NMR-spektroskopische Analyse konnte

nachgewiesen werden, dass trotz der Substitution eine Proteinfaltung stattfand, allerdings zeigte sich auch, dass die Modifikationen eine Destabilisierung zur Folge hatten. Das hochfeldigste Alkylsignal konnte bei -0.11 ppm beobachtet werden und war damit um 0.07 ppm gegenüber der Verbindung **(61)** ins Tieffeld verschoben.

Neben der Destabilisierung des Trimers zeigte sich, dass die erhöhte Hydrophobizität des N-Terminus dazu führte, dass die Verbindung **(72)** eine äußerst hohe Neigung zur Kristallisation hatte. Daher war es möglich, auch von dieser Mutante eine Kristallstruktur zu erhalten, welche im Zusammenhang mit den übrigen in Kapitel 4.5 ausführlich diskutiert werden soll.

Zur zusätzlichen Modifikation der Asp9-D-Ala10-Mutante sollte in einem weiteren Versuch Tyr2 gegen 2-Pyridinylalanin (Abbildung 117) ersetzt werden. Dabei sollte die Auswirkung eines N-terminalen polaren Heterozyklus hinsichtlich der Faltung überprüft werden. Das Pyridinylalanin selbst besitzt keine weitere Funktionalität und sollte ausschließlich als Modellverbindung/Platzhalter für spätere funktionelle Gruppen wie Beispielsweise Catechole – zur Ionenbindung - dienen. Hinsichtlich

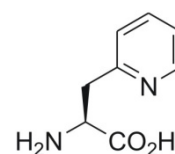


Abbildung 117
Struktur von
2-Pyridinylalanin.

der Synthese wurde auch der 2-Pyridinylalanin-Baustein als Boc-geschütztes Derivat eingesetzt, was entsprechend der Verbindung **(72)** zur Folge hatte, dass die Kupplung von Gyl1 nicht mehr möglich war. Die Synthese des [Δ Gly¹, 2-Pyr², D-Ala¹⁰, Pli¹⁷=Cat¹⁸]-Foldons gelang mit einer Gesamtausbeute von 28%, das ¹H-NMR-Spektrum ist in Abbildung 118 gezeigt.

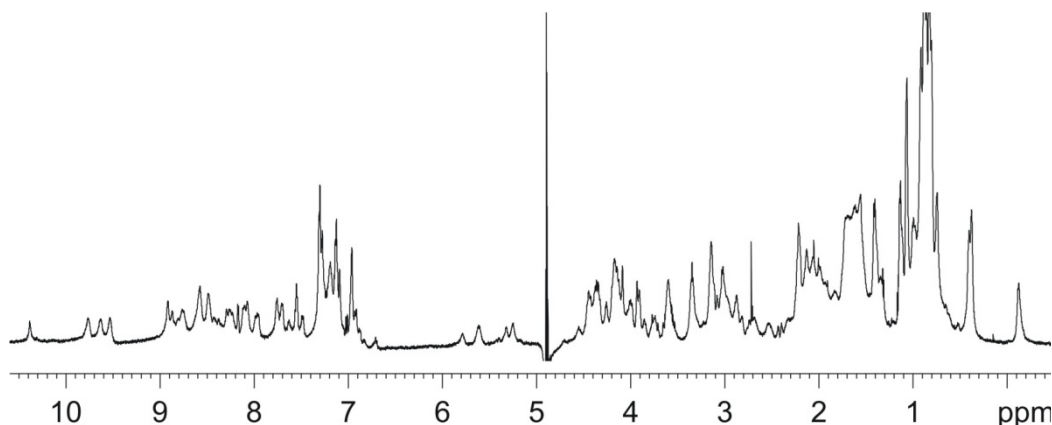


Abbildung 118 ¹H-NMR-Spektrum mit *WATERGATE* Wasserunterdrückung, 600 MHz, H₂O/D₂O 9:1, phosphatgepuffert pH = 7, Konzentration 2.3 mg/mL (**73**), Temperatur 287 K. Auch das 2-Pyridinylalanin-substituierte Foldon zeigt eine deutliche Faltung.

Auch diese Foldon-Mutante zeigt eine deutliche Faltung, wobei dieses Ergebnis nicht weiter überraschend ist, da im Weitesten nur die Polarität des Aromaten, welcher Tyr2 ersetzt, verändert wurde. Auch seitens der Verschiebung des hochfeldigsten Alkylsignals unterscheiden sich die beiden letzten Foldon-Derivate kaum. Die Verschiebung der 2-Nal2-Mutante betrug wie bereits erwähnt -0.11 ppm, die Verschiebung der 2-Pyr2-Mutante -0.10 ppm.

Die Substitution von Tyr2 erscheint grundsätzlich gegen jede andere aromatische Aminosäure, selbst unter Wegfall von Gly1, möglich zu sein, jedoch bedingt die Mutation am N-Terminus eine

Destabilisierung des Trimers. Hinsichtlich eventueller Anwendungen ist die N-terminale Modifikation des Foldons jedoch möglich. Gegebenenfalls könnte beispielsweise durch die Ionenbindung am N-Terminus sogar eine Stabilisierung der gefalteten Struktur bewirkt werden.

4.1.9 Einführung eines N-terminalen Azidoglycins zur Ligation

Die *Click-Reaktion* ist eine [3,2]-dipolare Cycloaddition zwischen einem Alkin und einer Azidofunktionalität. Durch Zugabe von Metallsalzen (Cu^{I} bzw. Ru^{I}) als Katalysatoren erfolgt eine Beschleunigung dieser ansonsten sehr langsam verlaufenden Reaktion und zusätzlich eine Steuerung der Regioselektivität (Abbildung 119).^[163-166]

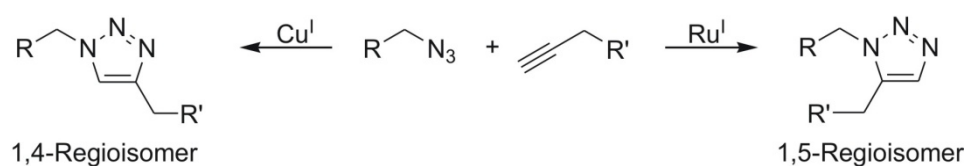


Abbildung 119 Regioselektiver Verlauf der *Click-Reaktion* in Gegenwart verschiedener Metallsalze.

Mittels *Click-Reaktion* ist es weiterhin möglich, Peptide und Proteine selektiv und schutzgruppenfrei zu modifizieren.^[167] Daher erschien es sehr interessant, ein Azid im Foldon einzuführen, um somit nachfolgende Reaktionen, wie beispielsweise die Ligation eines zweiten Peptids, zu ermöglichen. Die N-terminale Modifikation erschien hierbei in vieler Hinsicht am sinnvollsten. Wie sich bereits gezeigt hatte, besaßen N-terminale Modifikationen nur einen geringen Einfluss auf die Trimerisierung. Auch seitens der sterischen Ansprüche zusätzlicher Peptidfragmente im Fall einer Ligation war der N-terminale Bereich gut geeignet (entsprechend **(67)**).

Die Azidofunktionalität wurde durch eine Substitution von Gly1 gegen Azidoglycin eingeführt, die Darstellung des $[\text{N}_3\text{-Gly}^1\text{-D-Ala}^{10}, \text{Pli}^{17}=\text{Cat}^{18}]$ -Foldons (**74**) gelang mit einer Ausbeute von 16% bezogen auf Synthese und Aufreinigung. NMR-spektroskopisch zeigte sich, dass die Azidoglycin-Mutation beinahe keinen Einfluss auf die Stabilität des Trimers auswirkte. Während bei der Asp9-D-Ala10-Mutante die maximale Hochfeldverschiebung -0.18 ppm betrug, zeigt die Azidoglycin-Mutante

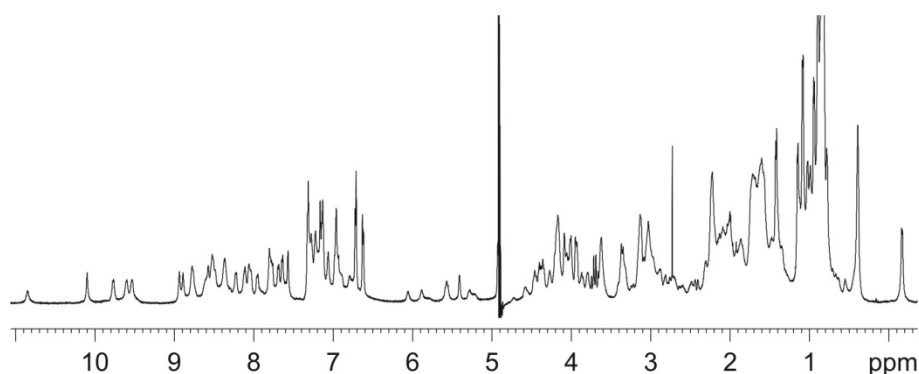


Abbildung 120 ^1H -NMR-Spektrum mit *WATERGATE* Wasserunterdrückung, 600 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, phosphatgepuffert pH = 7, Konzentration 3.6 mg/mL (**74**), Temperatur 287 K. Die Faltung der Azidoglycin-Mutante ist deutlich zu erkennen.

eine Verschiebung von -0.16 ppm. Das ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung (**74**) ist in Abbildung 120 dargestellt. Um zu überprüfen, ob das N-terminale Azidoglycin für die Ligation verwendbar war, sollte eine Umsetzung des Azido-Foldons mit Propargylalkohol entsprechend Abbildung 121

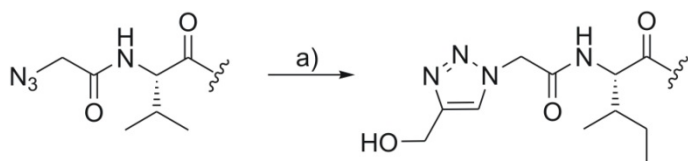


Abbildung 121 Umsetzung von (**74**) mit Propargylalkohol. a) Propargylalkohol, $\text{Cu}^{\text{II}}\text{SO}_4$, $\text{Na}(+)\text{-L-Ascorbat}$, NEt_3 .

stattfinden. Die Reaktion wurde mit $\text{Cu}^{\text{II}}\text{SO}_4$ und $\text{Na}(+)\text{-L-Ascorbat}$ sowie Triethylamin in Wasser durchgeführt, es zeigte sich, dass bereits nach einer halben Stunde weit mehr als die Hälfte des Azido-Foldons zum 1,4-Triazol

umgesetzt war, nach etwa zwei Stunden konnte mittels HPLC kein Edukt mehr nachgewiesen werden. Daher erscheint es möglich, ein entsprechend modifiziertes Foldon zur Ligation einzusetzen und möglicherweise als Templat für die Trimerisierung bzw. Kristallisation anderer Peptide zu verwenden.

4.1.10 Modifikationen des β -turns im Foldon

Kieffhaber *et al.* konnten nachweisen, dass dem β -turn des Foldons seitens der Proteinfaltung eine zentrale Rolle durch die Stabilisierung des β -Faltblatts zukommt.^[141] Um zusätzliche Erkenntnisse diesbezüglich zu gewinnen, sollten weitere Foldon-Mutanten mit

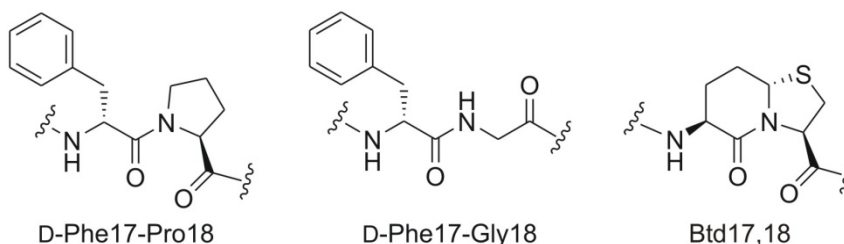


Abbildung 122 Durchgeführte Modifikationen des β -turns der Asp9-D-Ala10 Mutante.

unterschiedlichen Substitutionen innerhalb des β -turns dargestellt werden. Weiterhin wurde erwartet, dass andere β -turn-modifizierte Mutanten durch die Gegenüberstellung mit Pli=Cat

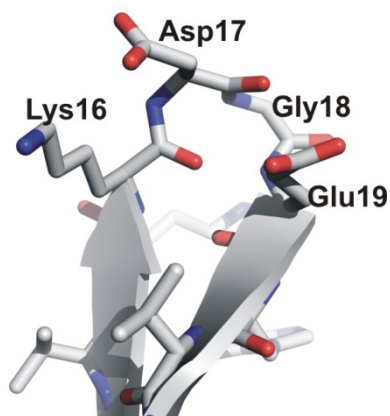


Abbildung 123 Ausschnitt der Kristallstruktur von Engel *et al.* die den β -turn zeigt.^[143]

zusätzliche Hinweise auf die Eigenschaften des Dipeptidbausteins liefern würden. Die Asp-17-Gly18-Einheit der Asp9-D-Ala10-Mutante sollte im Weiteren durch D-Phe17-Pro18, D-Phe17-Gly18 und Btd17,18 ersetzt werden (Abbildung 122). Die Sequenz D-Phe-Pro wurde gewählt, weil diese dafür bekannt war, im Gramicidin S einen β -turn zu bilden.^[168, 169] Die D-Phe-Gly-Mutante sollte eine der Asp17-Gly18-Sequenz nachempfundene Modifikation unter Einbeziehung einer D-Aminosäure darstellen. Von besonderem Interesse war die Verwendung des Btd als β -turn-Mimetikum. In Kapitel 3.3.1 konnte durch die

Gegenüberstellung von Pli=Cat und Btd gezeigt werden, dass die flexible Struktur des Btd grundsätzlich nicht zur selbständigen Ausbildung eines β -turns geeignet ist, dieses Mimetikum aber durch seine Umgebung gut in eine solche Konformation gezwungen werden konnte. In diesem Zusammenhang war fraglich, ob die strukturellen Gegebenheiten des Foldons ausreichen würden, die Ausbildung eines β -turns seitens des Btd hervorzurufen, oder ob das Vorhandensein eines β -turns obligatorische Grundlage der Proteinfaltung sei. Grundsätzlich sollte der β -Faltblatt-strukturierte Bereich des Foldons eine stabilisierende Auswirkung auf den β -turn haben (Abbildung 123), wobei dieser bisher stets in Zusammenhang mit einem vorhandenen Turn betrachtet worden ist.

Die Synthese von [D-Ala¹⁰, D-Phe¹⁷, Pro¹⁸]-Foldon (**75**), [D-Ala¹⁰, D-Phe¹⁷]-Foldon (**76**) und [D-Ala¹⁰, Btd^{17,18}]-Foldon (**77**) gelang in guten Ausbeuten von 13%, 7% und 15%. Erstaunlicherweise zeigten alle drei Mutanten eine Faltung im ¹H-NMR-Spektrum, wobei deutliche Unterschiede hinsichtlich der

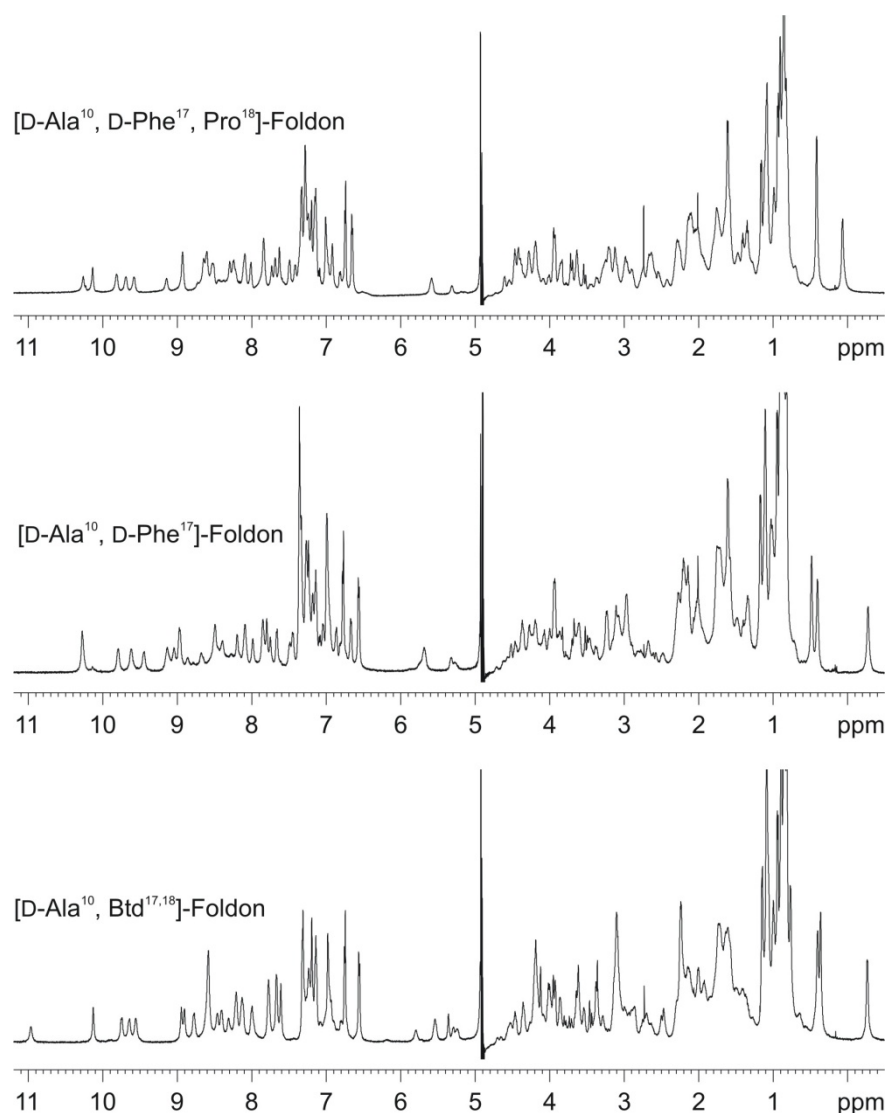


Abbildung 124 ¹H-NMR-Spektrum mit WATERGATE Wasserunterdrückung, 600 MHz, H₂O/D₂O 9:1, phosphatgepuffert pH = 7, Konzentration 4.4 mg/mL (**75**) und 3.8 mg/mL (**76**), 3.9 mg/mL (**77**), Temperatur 287 K. Jede der drei Mutanten zeigt eine deutliche Faltung, während die maximale Hochfeldverschiebung sehr unterschiedlich ausgeprägt ist.

Hochfeldverschiebung der Alkylsignale beobachtet werden konnten. Die Spektren der jeweiligen Verbindungen sind in Abbildung 124 dargestellt.

So betrugen die maximalen Verschiebungen -0.28 ppm (D-Phe17-Gly18), -0.24 ppm (Btd17,18) und $+0.06$ ppm (D-Phe17-Pro18). Das Vorhandensein des Pro18 hat im Vergleich zu Gly18 einen erheblichen Einfluss auf die maximale Hochfeldverschiebung, wahrscheinlich resultiert dieser aus der konformative Einschränkung sowie dem zusätzlichen sterischen Anspruch des Prolins. Damit wird verdeutlicht, dass der β -turn an den Positionen 17 und 18 ein gewisses Maß an Flexibilität seitens der besetzenden Aminosäuren voraussetzt. Auch vom [D-Ala¹⁰, D-Phe¹⁷]-Foldon konnten Kristalle erhalten und die exakte Struktur des Trimers bestimmt werden. Zusammen mit den übrigen Strukturen soll auch die Diskussion dieser Verbindung später erfolgen (Kapitel 4.5).

Die Verwendung von Btd anstelle von Asp17-Gly18 lieferte erstaunlich stark ins Hochfeld verschobene Alkylsignale. Im Vergleich zu Pli=Cat war das Btd-analoge Foldon um 0.06 ppm stärker verschoben. Unter der Annahme, dass eine Korrelation zwischen der hochfeldigen Alkylverschiebung und der Stabilität des Trimers besteht, würde dies den Rückschluss zulassen, dass das Btd sich besser in die *Turn*-Region des Foldons einpasst. Der Vergleich des D-Phe17-Pro18- und des D-Phe17-Gly18-Foldons hatte bereits angedeutet, dass eine verringerte konformative Einschränkung ein stabileres Trimer bedingt. Aufgrund der Flexibilität des Btds ist dieses wahrscheinlich eher dazu in der Lage, durch die umgebende Struktur in eine passende Konformation gezwungen zu werden, als es bei dem starrereren Pli=Cat erfolgen kann. In Hinsicht auf die Fähigkeit, einen β -turn zu induzieren, ist Pli=Cat das *Turn*-Mimetikum, dass wegen seiner konformative Einschränkung sehr viel besser dazu geeignet ist. Das Btd jedoch ist im Fall des Foldons besser in der Lage den β -turn passiv auszufüllen.

4.1.11 Alaninscan der Salzbrücke zwischen Lys16 und Glu19

In der Kristallstruktur des Foldons von Engel *et al.* hatte sich gezeigt, dass Lys16 und Glu19 trotz ihrer räumlichen Nähe in keiner direkten Wechselwirkung miteinander stehen.^[132] Seitens der

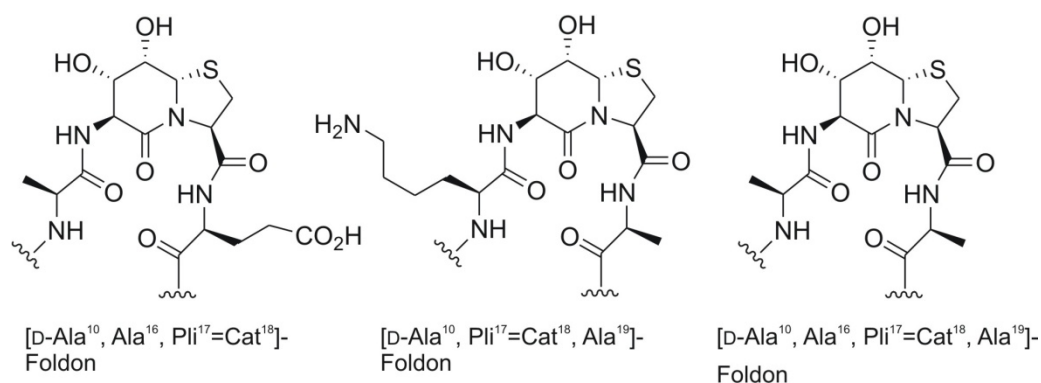


Abbildung 125 Abbildung der Verbindungen (78) (links), (79) (mitte) und (80) (rechts).

Wechselwirkung in Lösung konnten diesbezüglich bisher keine Aussage getroffen werden. Daher sollte anhand des Austauschs der beiden Aminosäuren gegen Alanin die Auswirkung der Substitution

untersucht werden um so Rückschlüsse auf eventuelle Wechselwirkungen der beiden Aminosäuren treffen zu können. Im Nachfolgenden wurden drei Mutanten des Foldons dargestellt, zum einen wurden jeweils nur Lys16 oder Glu19 gegen Ala ausgetauscht, zum anderen wurden beide Aminosäuren substituiert. Die Synthese der drei Verbindungen [D-Ala¹⁰, Ala¹⁶, Pli¹⁷=Cat¹⁸]-Foldon

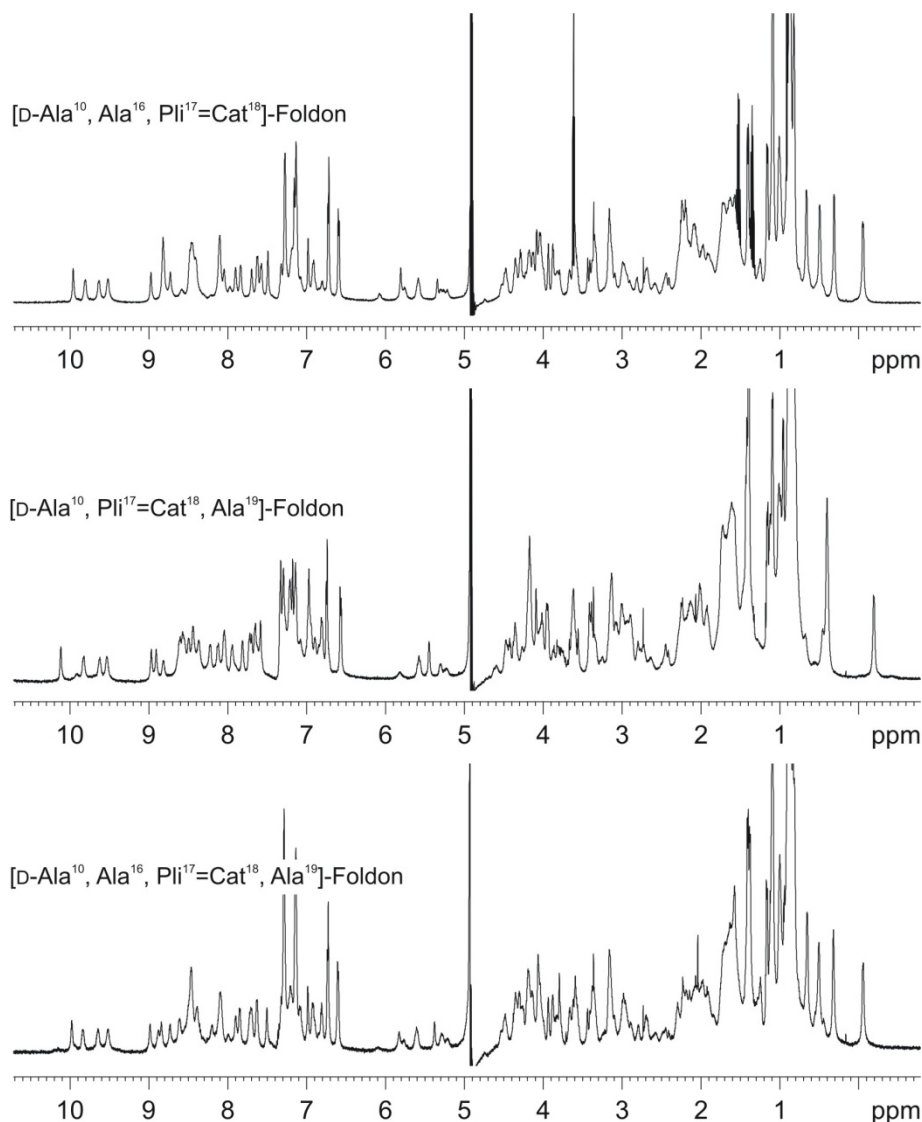


Abbildung 126 ¹H-NMR-Spektrum mit WATERGATE Wasserunterdrückung, 600 MHz, H₂O/D₂O 9:1, phosphatgepuffert pH = 7, Konzentration 4.4 mg/mL (78) und 3.1 mg/mL (79), 3.0 mg/mL (80), Temperatur 287 K. Trotz der unterschiedlichen Substitutionen durch Alanin zeigen alle Verbindungen eine Proteinfaltung.

(78), [D-Ala¹⁰, Pli¹⁷=Cat¹⁸, Ala¹⁹]-Foldon (79) und [D-Ala¹⁰, Ala¹⁶, Pli¹⁷=Cat¹⁸, Ala¹⁹]-Foldon (80) erfolgte mit Ausbeuten von 19%, 28% und 15% (Abbildung 125).

Die beiden einfach substituierten Mutanten zeigten seitens der Löslichkeit ein den übrigen Foldonen sehr ähnliches Verhalten, das doppelt substituierte Foldon hingegen war nur noch sehr schlecht im wässrigen Phosphatpuffer löslich. Dieses kann mit dem Fehlen der beiden löslichkeitsvermittelnden, polaren Gruppen begründet werden. Jedoch zeigten alle drei Verbindungen im ¹H-NMR eine Proteinfaltung, wobei deutliche Unterschiede seitens der Trimerstabilität bestanden. So besaß das

ausschließlich Glu19 substituierte Foldon mit -0.19 ppm die stärkste Hochfeldverschiebung, während die beiden anderen Foldone, das Lys16 sowie das doppelt Substituierte, eine identische Verschiebung von -0.05 ppm zeigten.

Somit kann Lys16 eine besondere Bedeutung seitens der Trimerstabilität zugeordnet werden, hingegen ist Glu19 ohne deutliche Einschränkungen substituierbar. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass entweder keine Salzbrücke zwischen den beiden Aminosäuren Lys16 und Glu19 besteht, oder zu mindestens dieser keine allzu stabilisierende Eigenschaft zukommt. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass Pli=Cat den β -turn so gut stabilisiert, dass eine ansonsten stabilisierende Wechselwirkung zwischen Lys16 und Glu19 nicht notwendig ist.

4.1.12 Untersuchung der Auswirkungen von D-Ala¹⁰ und Pli=Cat^{17,18} durch Einzelmutationen des nativen Foldons

Um den Einfluss der verschiedenen Modifikationen überprüfen zu können, war es notwendig, zum einen den Wildtyp und zum anderen die Einzelmutanten [D-Ala¹⁰]-Foldon und [Pli¹⁷=Cat¹⁸]-Foldon darzustellen. Aufgrund der zuvor erwähnten Aspartimidbildung unter Festphasenbedingung beim Vorliegen einer Asp-Gly-Sequenz, musste eine geeignete Schutzgruppe für Glycin gewählt werden. Da die freie Hydroxylgruppe des Hmb während der nachfolgenden Kupplungen jeweils acyliert bzw. entschützt wird und so die nachfolgenden Kupplungen mit einer erhöhten Anzahl an Äquivalenten durchgeführt werden müssen, fiel die Wahl auf die Dmb-Schutzgruppe.

Die Darstellung von Fmoc-(Dmb)Gly-OH gestaltete sich, nachdem das richtige Reduktionsmittel für die reduktive Aminierung gefunden war, als relativ einfach (Abbildung 127). Die Aminierung fand in Dichlormethan/Methanol und Triethylamin als Base statt, als Reduktionsmittel eignet sich besonders gut NaBH(OAc)₃,^[170] auch die reduktive Aminierung mit NaBH₃CN funktionierte, lieferte aber sehr viel geringere Ausbeuten seitens des Amins.

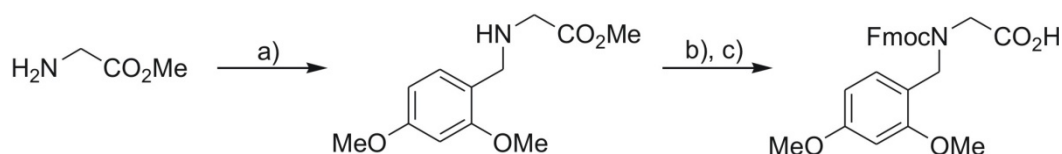


Abbildung 127 Synthese von Fmoc-(Dmb)Gly-OH. a) Reduktive Aminierung, Dmb-Aldehyd, NaBH(OAc)₃, b) Verseifen mit 1N LiOH in 1,4-Dioxan, c) Schützen mit Fmoc-OSu.

Die anschließende Esterhydrolyse sowie das Schützen mit Fmoc-OSu verliefen problemlos und liefern das gewünschte Produkt in hoher Reinheit und mit 73% Ausbeute bezogen auf alle drei Stufen.

Durch die Verwendung von Fmoc-(Dmb)Gly-OH konnten die Verbindungen wt-Foldon (**81**), [D-Ala¹⁰]-Foldon (**82**) und [Pli¹⁷=Cat¹⁸]-Foldon (**83**) in Ausbeuten von 8%, 6% und 12% epimerisierungsfrei sowie ohne das Auftreten von β -Peptiden dargestellt werden. Allerdings waren die Ausbeuten im Bezug auf frühere Synthesen eher gering, was mit der relativ schlecht verlaufenden Kupplung der Fmoc-Asparaginsäure auf das Dmb-geschützte Glycin zu erklären ist.

Erstmals bestand nun die Möglichkeit den Wildtyp selbst untersuchen zu können, mittels ^1H -NMR-Spektroskopie konnte die Faltung entsprechend der anderen Foldon-Mutanten überprüft werden. Es zeigt sich, dass die Trimerisierung hier ebenso wie bei den vorherigen Derivaten bestimmt werden konnte. Die Hochfeldverschiebung der Alkylsignale betrug -0.42 ppm beim Wildtyp und deutete damit auf eine sehr hohe Stabilität seitens des Trimers hin. Auch die anderen beiden Mutanten [D-Ala¹⁰]-Foldon und [Pli¹⁷=Cat¹⁸]-Foldon zeigten eine deutliche Faltung, die Hochfeldverschiebung der Alkylsignale wurde mit -0.39 ppm (D-Ala) und -0.26 ppm (Pli=Cat) bestimmt. Somit konnte

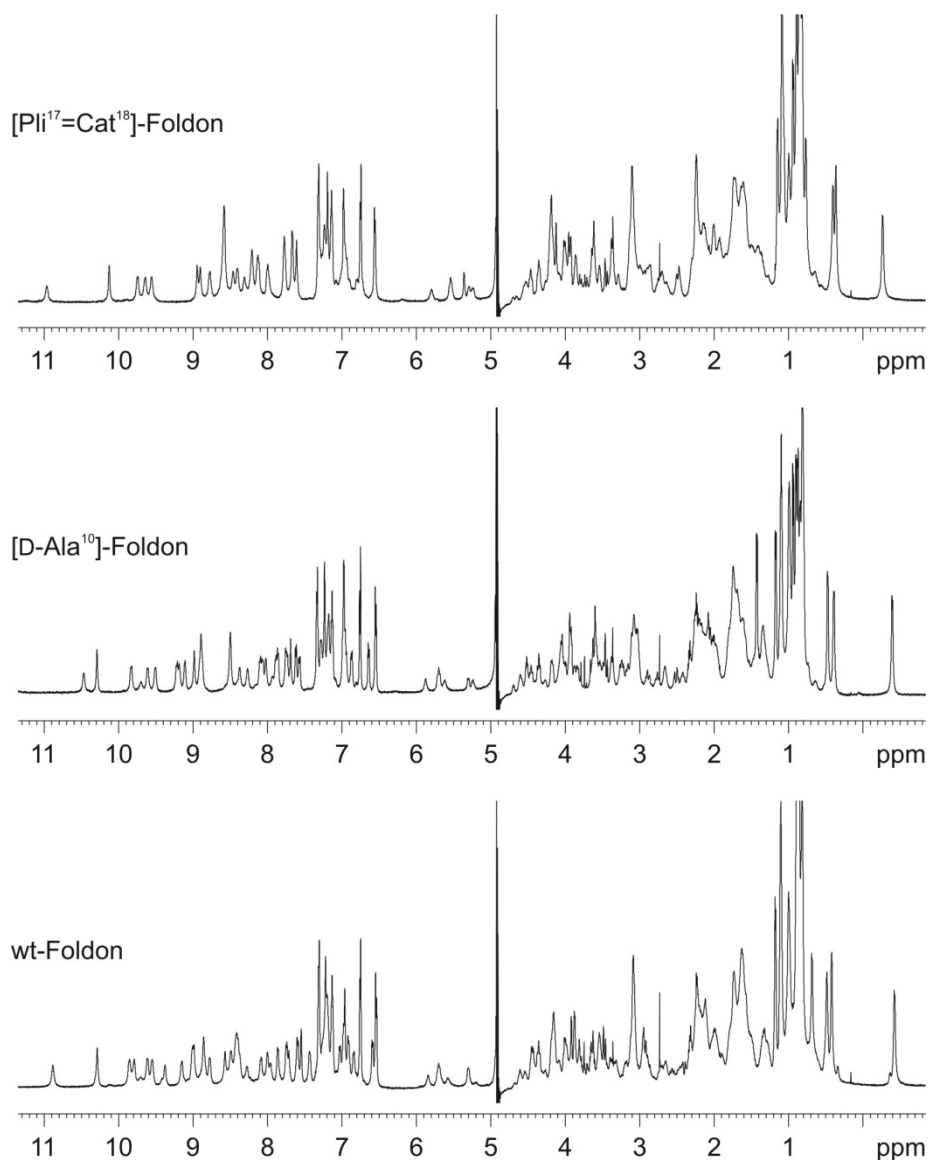


Abbildung 128 ^1H -NMR-Spektrum mit *WATERGATE* Wasserunterdrückung, 600 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, phosphatgepuffert pH = 7, Konzentration 3.9 mg/mL (81) und 2.6 mg/mL (82), 3.6 mg/mL (83), Temperatur 287 K.

nachgewiesen werden, dass beide Mutationen zu einer Destabilisierung der gefalteten Struktur führten, wobei der Beitrag seitens Pli=Cat17,18 um einiges größer war als derjenige, der durch D-Ala9 hervorgerufen wurde. In Abbildung 128 sind die einzelnen ^1H -NMR-Spektren der drei Verbindungen gezeigt. Trotz der unterschiedlich starken Hochfeldverschiebung der einzelnen Verbindungen (81),

(82) und (83), zeigten sich bei den drei vorliegenden Verbindungen kaum Unterschiede hinsichtlich der Aufspaltung des amidischen Bereichs. Die Dispersion war bei allen Verbindungen ähnlich, einzig die Verbindung $[\text{Pli}^{17}=\text{Cat}^{18}]$ -Foldon zeigte eine etwas stärkere Überlagerung der amidischen Protonen, was aber als phänomenologisch angesehen werden kann.

Nachdem insgesamt 24 verschiedene Foldon-Mutanten dargestellt wurde, von denen immerhin 15 eine Proteinfaltung zeigten, soll im Nachfolgenden auf die weitergehende Auswertung der spektroskopischen Daten eingegangen werden.

4.2 Vergleich der vorliegenden Foldon-Trimere seitens ihrer Stabilität

Anhand der vorliegenden Daten wurde eine Auflistung aller faltender Foldon-Derivate erstellt (Tabelle 9), die dazu dienen sollte, die durchgeführten Mutationen in Korrelation zur Stabilität der

Trimere zu setzen. Die Breite der Verteilung beläuft sich auf 0,45 ppm und ist damit sehr groß, entsprechend groß sind auch die Unterschiede der einzelnen Mutanten. Die maximale Hochfeldverschiebung wird durch das Collagen-stabilisierte Foldon mit -0,45 ppm erreicht. Mit einem etwas geringeren Wert von -0,42 ppm folgt der Wildtyp. Dementsprechend wäre der Beitrag der Stabilisierung seitens des Collagens erheblich, unter der Berücksichtigung, dass die vergleichbare Mutante ohne Collagen eine um 0,26 ppm verminderte Verschiebung zeigt. Die Substitution von Gly10 gegen D-Ala10 führt im Vergleich zu

Tabelle 9 Auflistung aller faltender Foldon-Derivate mit den jeweiligen maximalen Hochfeldverschiebungen.

Verbindung	δ (ppm)
$[\text{D-Ala}^{10}, \text{D-Phe}^{17}, \text{Pro}^{18}]$ -Foldon	0,01
$[\text{D-Ala}^{10}, \text{Pli}^{3,17}=\text{Cat}^{4,18}]$ -Foldon	0,01
$[\text{D-Ala}^{10}, \text{Ala}^{16}, \text{Pli}^{17}=\text{Cat}^{18}]$ -Foldon	-0,05
$[\text{D-Ala}^{10}, \text{Ala}^{16}, \text{Pli}^{17}=\text{Cat}^{18}, \text{Ala}^{19}]$ -Foldon	-0,05
$[\Delta\text{Gly}^1, \text{Pyr}^2, \text{D-Ala}^{10}, \text{Pli}^{17}=\text{Cat}^{18}]$ -Foldon	-0,10
$[\Delta\text{Gly}^1, \text{Nal}^2, \text{D-Ala}^{10}, \text{Pli}^{17}=\text{Cat}^{18}]$ -Foldon	-0,11
$[\text{N}_3\text{-Gly}^1, \text{D-Ala}^{10}, \text{Pli}^{17}=\text{Cat}^{18}]$ -Foldon	-0,16
$[\text{D-Ala}^{10}, \text{Pli}^{17}=\text{Cat}^{18}]$ -Foldon	-0,18
$[\text{D-Ala}^{10}, \text{Pli}^{17}=\text{Cat}^{18}, \text{Ala}^{19}]$ -Foldon	-0,19
$[\text{D-Ala}^{10}, \text{Btd}^{17,18}]$ -Foldon	-0,24
$[\text{Pli}^{17}=\text{Cat}^{18}]$ -Foldon	-0,26
$[\text{D-Ala}^{10}, \text{D-Phe}^{17}]$ -Foldon	-0,28
$[\text{D-Ala}^{10}]$ -Foldon	-0,39
$[\text{wt}]$ -Foldon	-0,42
$[\text{Pro}^{-2,-5,-8,-11,-14}, \text{Hyp}^{-1,-4,-7,-10,-13}, \text{Gly}^{-3,-6,-9,-12}, \text{D-Ala}^{10}, \text{Pli}^{17}=\text{Cat}^{18}]$ -Foldon	-0,45

den übrigen Modifikationen nur zu einer sehr geringen Veränderung der Hochfeldverschiebung.

Alle nachfolgenden Mutanten zeigen eine deutliche Veränderung seitens der Verschiebungen. Hierbei ist zu erwähnen, dass es bisher nicht möglich war, eine exakte Korrelation zwischen der Verschiebung und der tatsächlichen Stabilität herzustellen. Durch die Arbeitsgruppe *Kieffhaber et al.* wurde mittels Guanidinium-Chlorid induzierter Entfaltung das ΔG_0 des $[\text{D-Ala}^{10}, \text{Pli}^{17}=\text{Cat}^{18}]$ -Foldons bestimmt, mit einem Wert von $\Delta G_0 = -40,5$ kJ/mol lag die Stabilität weit unter derjenigen des nativen Foldons mit $\Delta G_0 = -89$ kJ/mol.^[141, 171] Einer Halbierung der Stabilität steht eine Veränderung der Hochfeldverschiebung um 0,23 ppm gegenüber, eine lineare Extrapolation für $\Delta G_0 = 0$ liefert einen Wert für die Verschiebung von 0 ppm. Da aber Verbindungen wie $[\text{D-Ala}^{10}, \text{D-Phe}^{17}, \text{Pro}^{18}]$ -Foldon eine

Hochfeldverschiebung in diesem Bereich zeigen und trotzdem eine Proteinfaltung zeigen, muss zu mindestens in den Grenzbereichen ein Abweichen von der linearen Abhängigkeit gegeben sein. Ohne das Vorliegen weiterer Werte für ΔG_0 , die in Korrelation zu den beobachteten Verschiebungen gesetzt werden können, kann die maximale Hochfeldverschiebung nur als relatives, dafür aber verlässliches Stabilitätskriterium herangezogen werden.

4.2.1 NMR-Titration zur Stabilitätsbestimmung der Foldon-Mutanten (61) und (81)

Eine andere Möglichkeit zur Bestimmung der Stabilitäten einzelner Foldone bestand in der Durchführung von NMR-Titrationsexperimenten. Hintergrund dieser Überlegung war ursprünglich die Fragestellung, ob das gemeinsame Vorliegen unterschiedlicher Foldone zur Bildung gemischter Trimere führen würde. Daher wurden ^1H -NMR-Spektren von Foldonmischungen verschiedener Verhältnisse aufgenommen und diese miteinander verglichen. Um den Verdünnungseffekt der Titration möglichst gering zu halten, wurde ein Foldon in relativ niedriger Konzentration vorgelegt und gegen eine möglichst hoch konzentrierte Lösung des anderen Foldons titriert. In Abbildung 129 ist die Titration des Wildtypes gegen das $[\text{D-Ala}^{10}, \text{Pli}^{17}=\text{Cat}^{18}]$ -Foldon gezeigt, wegen der bereits

vorliegenden Stabilitäten der beiden Foldone wurden die beiden oberen Verbindungen gewählt, da so die Qualität der erhaltenen Aussage aus dem Experiment bewerten werden konnte. Es zeigte sich, dass das Verhältnis zwischen der tatsächlich zugegebenen Mengen an $[\text{D-Ala}^{10}, \text{Pli}^{17}=\text{Cat}^{18}]$ -Foldon und der mittels Integration bestimmten eine deutliche Differenz aufwies. So betrug das Verhältnis entsprechend der Zugabe bereits 2:1, als mittels Integration ein

1:1 Verhältnis bestimmt werden konnte. Die Auftragung der relativen molaren Verhältnisse

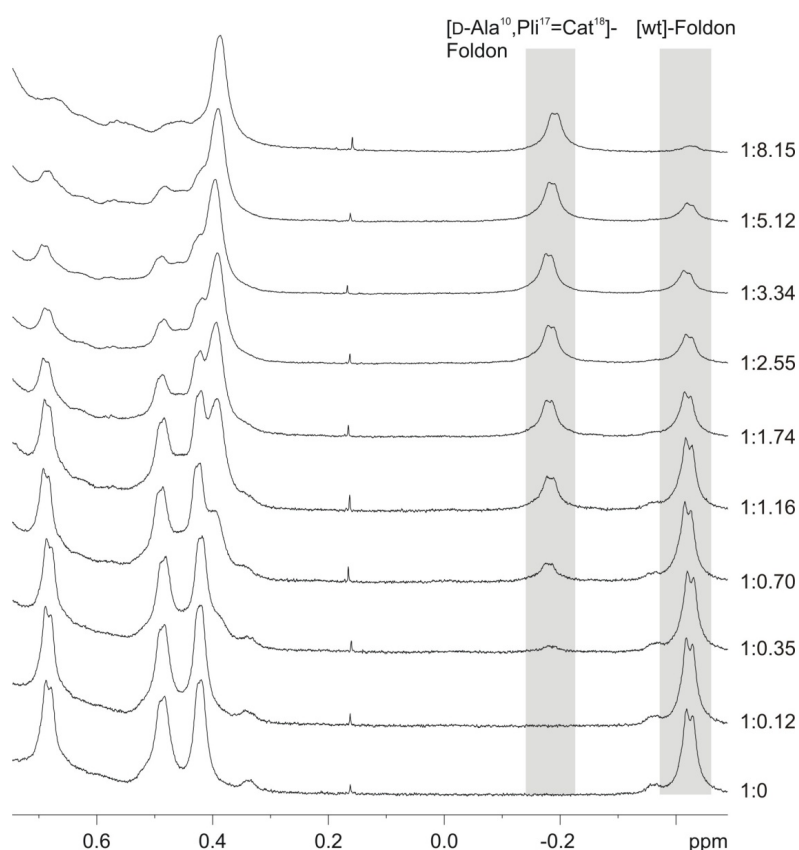


Abbildung 129 ^1H -NMR-Spektren mit WATERGATE Wasserunterdrückung, 600 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, phosphatgepuffert pH = 7, Ausgangskonzentration 1.8 mg/mL (81), Temperatur jeweils 287 K. Rechts sind die molaren Verhältnisse von (81) zu (61) entsprechend der Zugabe verzeichnet.

aus der Integration und aus der berechneten Zugabe ist in Abbildung 130 gezeigt.

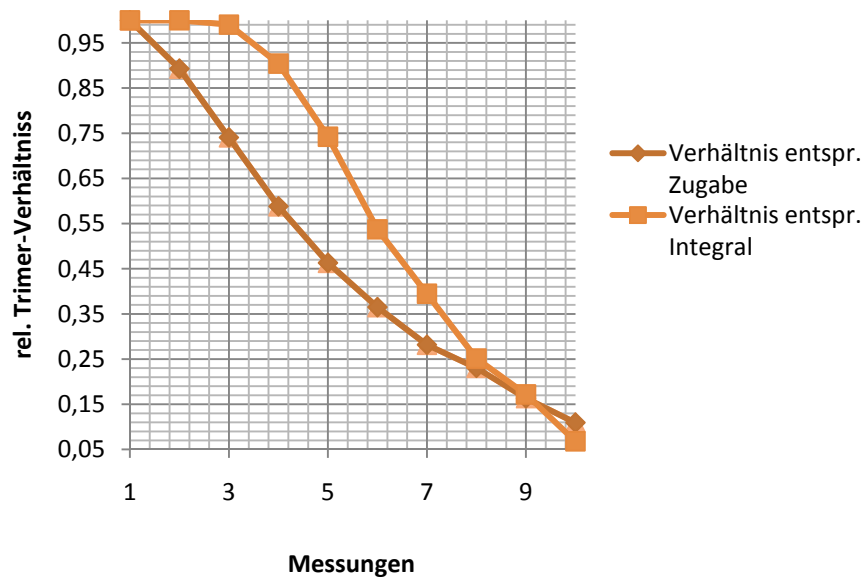


Abbildung 130 Auftragung der der relativen molaren Verhältnisse aus Integration (rot) und berechneter Zugabe (blau). Es zeigt sich eine Abweichung der beiden Kurven, durch die auf die Stabilität der Trimere geschlossen werden kann.

Entsprechend den ^1H -NMR-Spektren in Abbildung 129 zeigt die graphische Darstellung der beiden Kurven eine deutliche Abweichung. Interpretiert werden kann dieses Verhalten dahingehend, dass ein Austausch einzelner Foldon-Stränge zwischen den Trimeren stattfindet. Wichtig ist hierbei die Annahme, dass auch die Bildung der gemischten Trimere ähnlich schnell verläuft wie die Trimerisierung der einzelnen Komponenten. *Kiefhaber et al.* konnten zeigen, dass ab einer Proteinkonzentration von $>10\ \mu\text{M}$ die Trimerisierung im Millisekundenbereich abläuft, da bereits die Ausgangskonzentration von etwa $60\ \mu\text{M}$ für den Wildtyp weit über der angegebenen Konzentration liegt, ist auch in der in Abbildung 129 gezeigten Versuchsreihe von einer sehr schnellen Trimerisierung auszugehen.^[141]

Aufgrund der für die NMR-Spektroskopie niedrigen Konzentration sowie der aufgehobenen C_3 -Symmetrie der gemischten Trimere sind diese in den ^1H -NMR-Spektren nicht zu erkennen. Je stabiler das einheitliche Trimer, desto höher muss die Ausgangskonzentration des anderen Foldons sein, um das Gleichgewicht in Richtung der gemischten Trimere zu verschieben. Daher resultiert auch die Induktionsphase, die in Abbildung 130 für die relative Verteilung entsprechend des Integrals zu sehen ist.^[172] Die geringere Trimerstabilität der Mutante bedingt die Bildung von gemischten Trimeren, welche wiederum wegen der sehr geringen Konzentration nicht zu beobachten sind. Ab einer gewissen Konzentration des $[\text{D-Ala}^{10}, \text{Pli}^{17}=\text{Cat}^{18}]$ -Foldons ist es möglich, Signale für das einheitliche Trimer zu beobachten. Aus der weiteren Konzentrationserhöhung der Mutante resultiert ein verstärkter Austausch des Wildtyps, wodurch die Abnahme der wt-Foldon zugehörigen Signale erklärt wird. Es gelang nach Beendigung der NMR-Titration sogar Kristalle zu erhalten, welche direkt aus der zum Ende hin sehr hoch konzentrierten Lösung ausfielen. Zum Zeitpunkt der Beendigung

dieser Arbeit konnte die Kristallstruktur noch nicht vollständig gelöst werden, es deutete sich jedoch an, dass sich gemischte Trimere ausbildeten. Unter Berücksichtigung des neunfachen Überschusses der Mutante und dem Auftreten von zwei Trimeren in der Einheitszelle, welche bereits bestimmt werden konnte, sowie der etwa doppelt so hohen Stabilität des Wildtyps, sollte in der asymmetrischen Einheit mindestens ein wt-Foldon vorhanden sein. Die NMR-Titration lieferte interessante Ergebnisse seitens des Austauschs zwischen zwei verschiedenen Foldonen, konnte aber die Fragestellung nach der Stabilität nur indirekt beantworten. Um eine erste Aussage hinsichtlich der Trimerstabilität treffen zu können, scheint diese Methode ungeeignet, da sie zum einen sehr langwierig ist sowie einen hohen Substanzverbrauch mit sich bringt.

4.3 Überblick über die Modifikationen

Insgesamt wurden in den 24 dargestellten Foldonen 16 von 27 Aminosäuren der nativen Sequenz ersetzt (Abbildung 131). Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede der Stabilitäten der einzelnen Mutanten. Es konnte gezeigt werden, dass Asp9 unersetzlich für die Proteinfaltung ist. Durch einen Dipeptidscan der helikalen Bereiche des Foldons konnte weiterhin herausgearbeitet werden, dass ausschließlich der Bereich von Gly1 bis Pro4 Substitutionen toleriert. Darauf aufbauend wurden einige N-terminal substituierte, faltende Foldone erfolgreich synthetisiert. Der β -turn konnte durch verschiedene Sequenzen ersetzt werden, wodurch sich zeigte, dass die Trimerstabilität in direktem Zusammenhang mit der Flexibilität der Substituenten stand. Durch einen Alaninscan konnte weiterhin die Bedeutung von Lys16 hinsichtlich der Stabilität aufgezeigt werden.

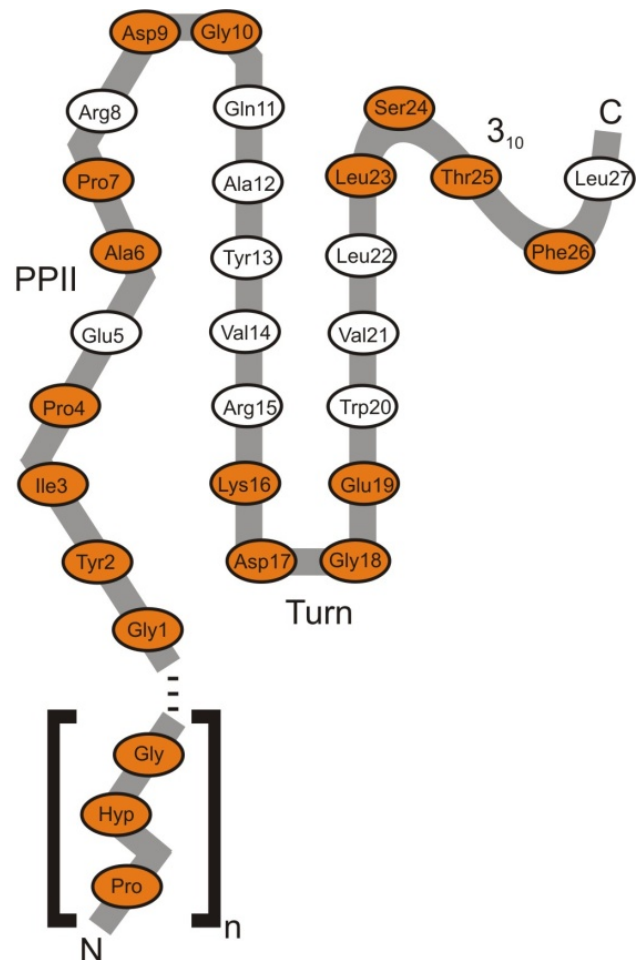


Abbildung 131 Darstellung des schematischen Foldons inklusive aller Modifikationen (orange).

4.4 Betrachtung der Kristallisationsneigung der Foldone: Stabilität versus Flexibilität

Es war möglich, die Verbindungen [Δ Gly¹, NaI², D-Ala¹⁰, Pli¹⁷=Cat¹⁸]-Foldon und [D-Ala¹⁰, D-Phe¹⁷]-Foldon als einheitliche Kristalle sowie [D-Ala¹⁰, Pli¹⁷=Cat¹⁸]-Foldon / [wt]-Foldon als Mischkristall zu erhalten. Berücksichtigend, dass es bisher nicht möglich war, dass [wt]-Foldon zu kristallisieren und dessen Struktur zu lösen, sollten die erhaltenen Kristallstrukturen weitreichend zum Verständnis des Foldons beitragen. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage nach dem Hintergrund der erhöhten Kristallisationsneigung der Foldon-Mutanten. Wie bereits zuvor festgestellt wurde, weisen die kristallisierten Mutanten eine deutlich geringere Trimerstabilität als der Wildtyp auf, trotzdem scheint die Bildung von Trimeren im Festkörper bevorzugt.

Durch die verschiedenen Substitutionen im β -turn konnte ein Zusammenhang zwischen der konformativen Einschränkung und der Stabilität des gefalteten Foldons hergestellt werden. Demnach war seitens der Stabilität eine besonders hohe Dynamik im β -turn von Vorteil. Für die Kristallisation hingegen scheint eine Einschränkung der Freiheitsgrade in diesem Bereich eine deutliche Triebkraft zu sein. Daher konnten vor allem die im β -turn konformativ eingeschränkteren Foldone zur Kristallisation gebracht werden. Das Erklärungsmodell, dass eine konformative Einschränkung sich positiv auf die Kristallisationsneigung auswirkt, erscheint in diesem Zusammenhang schlüssig.

Einen zusätzlichen Beitrag zur Kristallisation der Pli=Cat-Mutanten lieferten die freien Hydroxylgruppen des Dipeptidbausteins. Wie später noch gezeigt werden soll, sind diese in der Lage durch Wechselwirkungen mit anderen Peptidsträngen innerhalb eines Trimers eine zusätzliche Stabilisierung im Kristall herbeizuführen. Durch die hohe Neigung zur Bildung von Kristallen war es wahrscheinlich sogar möglich, den Wildtyp in Form eines gemischten Trimers auszukristallisieren.

Insgesamt beweist sich damit die Substitution von Asp17-Gyl18 gegen Pli=Cat als sehr vorteilhaft und zeigt das Potential des Dipeptidbausteins auf sehr eindrucksvolle Weise.

4.5 Diskussion der Proteinkristallstrukturen

Die röntgenkristallographische Charakterisierung der Proteinkristalle sowie die anschließenden Strukturbestimmungen erfolgten durch die Arbeitsgruppe *Essen*. In Tabelle 10 sind die Daten der beiden Proteinkristallstrukturen aufgelistet. Die Bestimmung der exakten Strukturen wurde jeweils mittels *molecular replacement* erreicht.

Tabelle 10 Wiedergabe der relevanten Daten seitens Datenaufnahme & Prozessierung sowie Angaben zur Verfeinerung der Strukturen.

Datenaufnahme & Prozessierung		
Bezeichnung des Datensatzes	(76) [D-Ala ¹⁰ , D-Phe ¹⁷]	(72) [NaI ² , D-Ala ¹⁰ , Pli ¹⁷ =Cat ¹⁸]
Röntgenquelle	ID23-1, ESRF, Grenoble, Frankreich	ID23-1, ESRF, Grenoble, Frankreich
Detektor	ADSC Quantum Q315r	ADSC Quantum Q315r
λ der Röntgenstrahlung (Å)	0.76990	0.76990
Raumgruppe	<i>P</i> 32	<i>P</i> 1
Zelldimensionen (Å)	a = 29.830, b = 29.830, c = 75.080	a = 27.730, b = 28.500, c = 48.755
Winkel (°)	a = 90.000, b = 90.000, c = 120.000	a = 77.250, b = 88.000, c = 69.450
Auflösung (Å)	20.00 - 1.03 + 3.10 - 0.98	30-2.2 (2.32-2.20)
Temperatur (K)	100	100
Beobachtete Reflexe	98885 (3961)	115501 (5604)
Multiplizität	2.3 (2.9)	2.0 (3.0)
Einzigartige Reflexe	42623 (1368)	58056 (1854)
R_{merge} (%)	0.052 (0.037)	0.029 (0.024)
Vollständigkeit (%)	99.2 (99.2)	94.1 (95.0)
$I/\sigma(I)$	10.4 (23.4)	19.2 (38.2)
Mosaizität (°)	0.45	0.31
Wilson B-factor (Å ²)	7.139	4.406
Statistiken zur Verfeinerung		
Auflösung (Å)	17.975 - 0.980	26.02 - 1.06 (1.089 - 1.061)
R_{work} (%), R_{free} (%)	0.136, 0.153	0.114, 0.144
Reflexe R_{work} - und R_{free} -Satz	work: 41289 test:1300	work: 56886; test: 1170
r.m.s.d. Bindungen (Å)	0.011	0.006
r.m.s.d. Winkel (°)	1.198	2.585
Gesamte Anzahl der Atome	909	2025
Mittlere B-Wert (Å ²)	7.399	7.125

4.5.1 Struktur des [Δ Gly¹, Nal², D-Ala¹⁰, Pli¹⁷=Cat¹⁸]-Foldons

Das [Δ Gly¹, Nal², D-Ala¹⁰, Pli¹⁷=Cat¹⁸]-Foldon kristallisierte aus Niedrigsalzbedingungen in der Raumgruppe *P*1. Es zeigte sich, dass in der asymmetrischen Einheit zwei Foldon-Trimere vorhanden waren, deren C_3 -Achsen mit einer Abweichung von etwa 30° gegeneinander verkippt waren. (Abbildung 132).

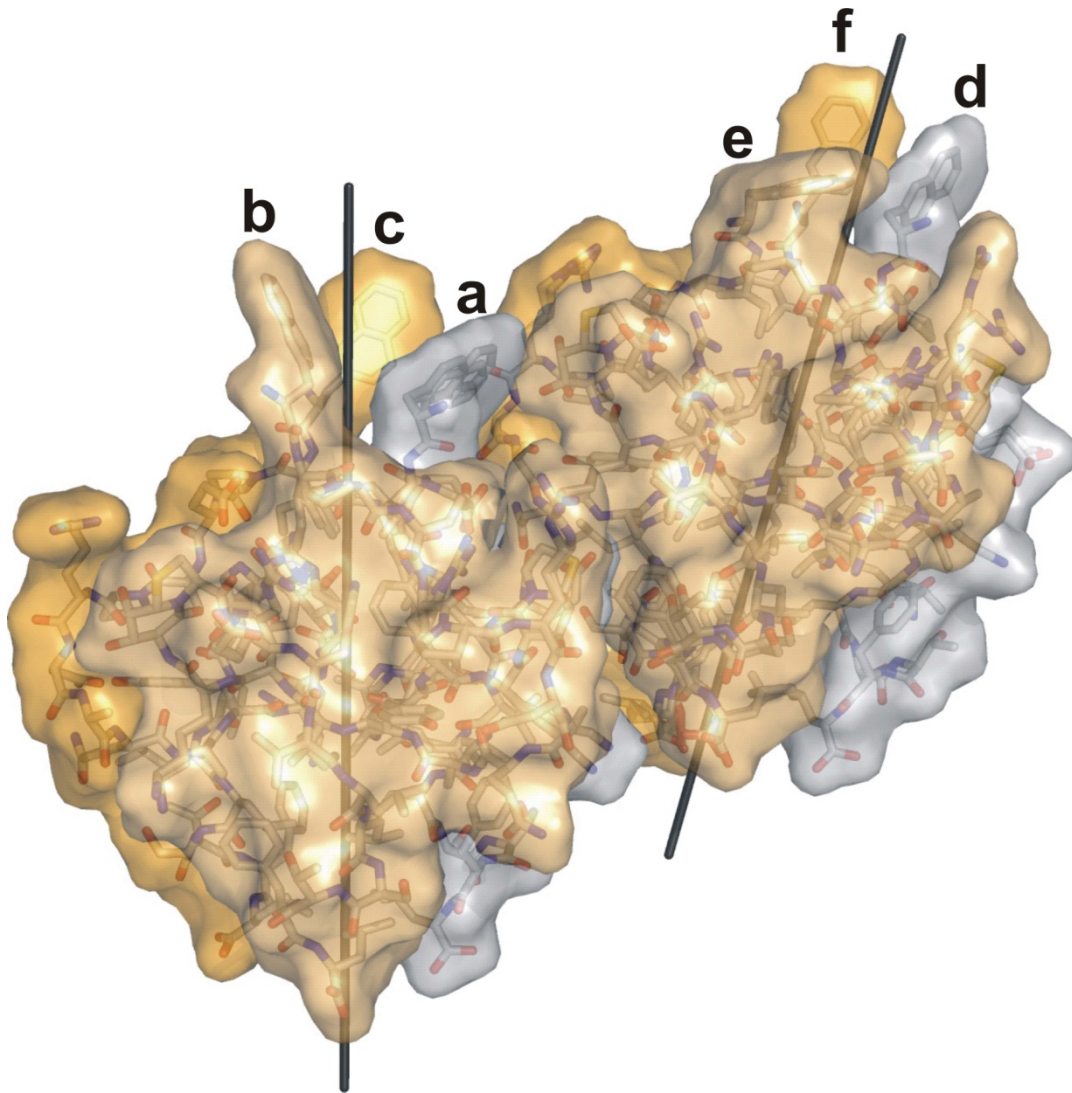


Abbildung 132 Darstellung der beiden Trimere mit eingezeichneter C_3 -Symmetrieachse. Es zeigt sich deutlich, dass beide Achsen gegeneinander verkippt sind. Weiterhin sind die monomeren Untereinheiten mit a-f zur Unterscheidung gekennzeichnet.

Zur besseren Unterscheidung der monomeren Untereinheiten sind diese in Abbildung 132 unterschiedlich farbig hervorgehoben. Eine nähere Betrachtung eines einzelnen Trimers zeigt sehr deutlich die C_3 -Symmetrie. In Abbildung 133 ist eines der beiden Trimere (d, e, f) aus der oberen Abbildung gezeigt. Hervorgehoben sind hierbei die Sekundärstrukturelemente des Foldons f sowie in orange die substituierten Aminosäuren.

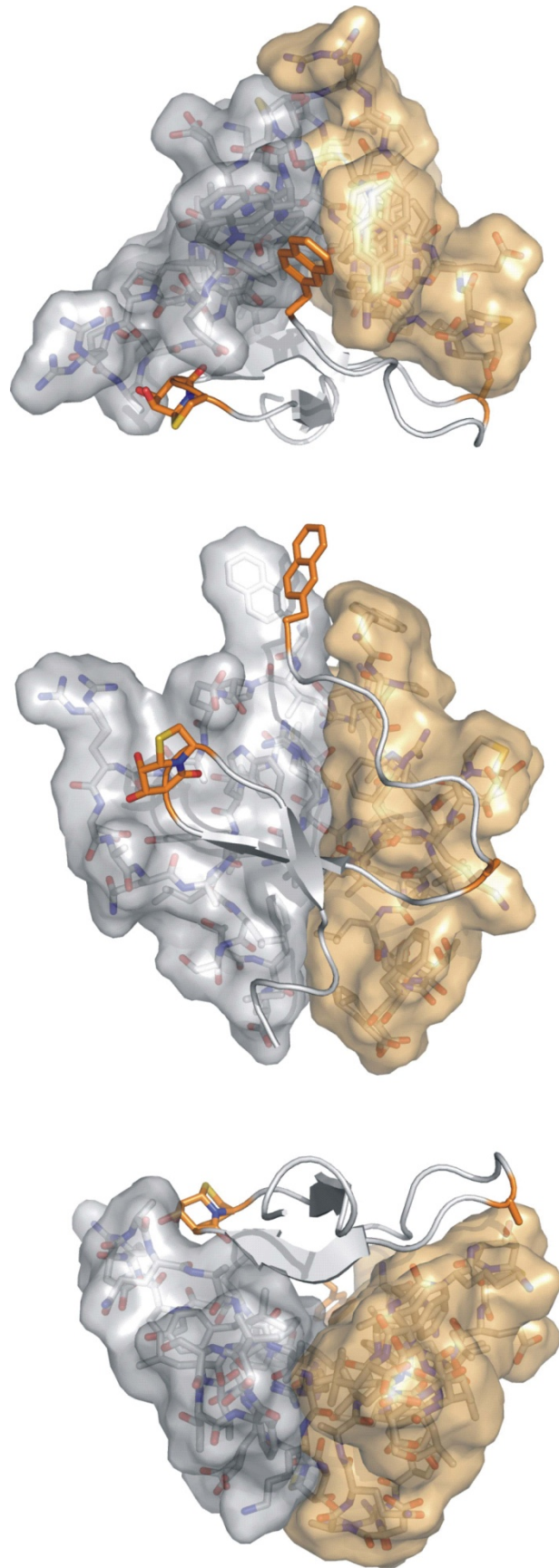


Abbildung 133 Aufsicht auf ein einzelnes Trimer von oben, von vorne sowie von unten, jeweils entlang der C₃-Symmetrieachse. Dargestellt sind weiterhin die Sekundärstrukturelemente sowie in orange hervorgehoben die substituierten Aminosäuren.

Die Qualität der Kristallstrukturdaten wird unter anderem durch die Auflösung wiedergegeben. In Abbildung 134 ist dazu die Elektronendichte für ein Foldon sowie für zwei ausgewählte Bereiche

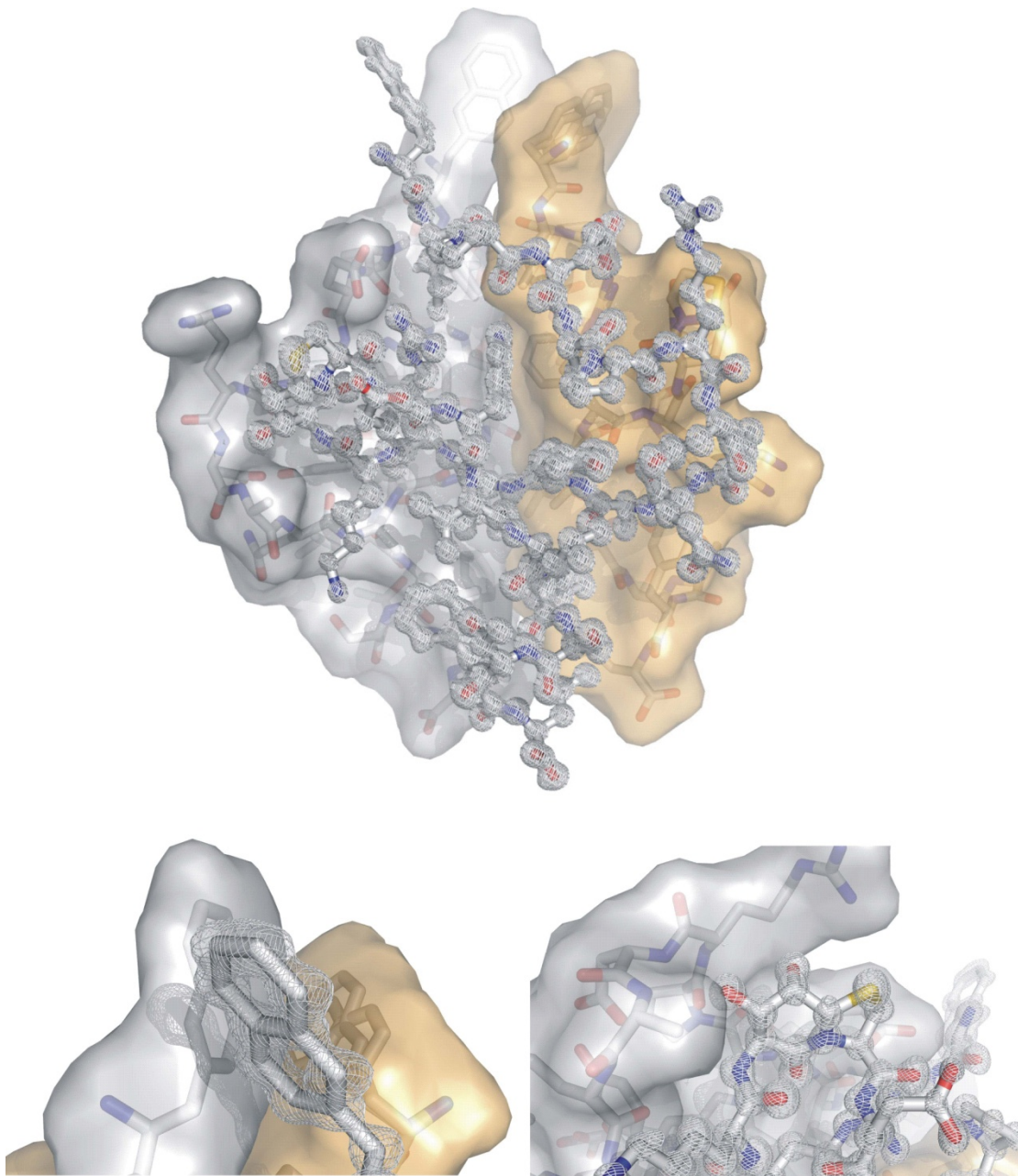


Abbildung 134 Darstellung der Elektronendichte. Oben: Abbildung eines vollständigen Foldons mit der dazugehörigen Elektronendichte. Unten: Hervorhebung von zwei Modifikationen inklusive der entsprechenden e-Dichte. Dargestellt ist die Elektronendichte $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$, der Konturierungslevel der Abbildungen beträgt $1/\sigma = 2$ bzw. $1/\sigma = 1$ für die Darstellung des 2-Nal2 (links, unten).

gezeigt. Aufgrund der atomaren Auflösung von 1.06 Å war es möglich, jedes Atom exakt zu positionieren. In Abbildung 134 ist weiterhin dargestellt, wie gut Pli=Cat durch seine Wechselwirkungen mit einem weiteren Foldon des Trimers ähnlich einer Hand umschlossen wird.

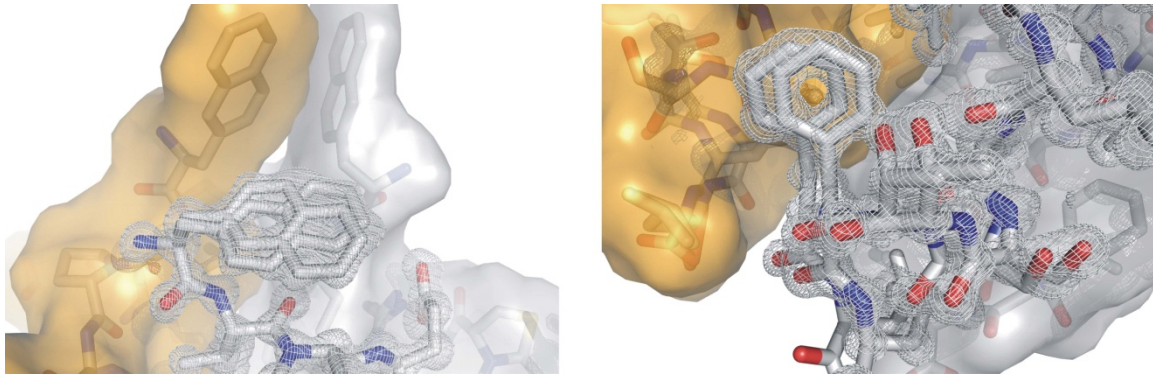


Abbildung 135 Darstellung der vorkommenden konformativen Unterschiede im Foldonkristall sowie deren zugehörige Elektronendichte. Dargestellt ist die Elektronendichte $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$, der Konturierungslevel der Abbildungen beträgt $1/\sigma = 1$.

Auch die konformativen Abweichungen konnten anhand der Elektronendichte nachgewiesen werden und sind in Abbildung 135 gezeigt. Aufgrund der hohen Auflösung konnten verschiedene Konformationen für einzelne Aminosäuren (beispielsweise 2-Nal2 oder Phe26) bestimmt werden. Der Vergleich der sechs monomeren Untereinheiten der asymmetrischen Einheit zeigt, dass eine Mikroinhomogenität vorliegt, welche sich vor allem in der Ausrichtung der Seitenketten äußert. Es

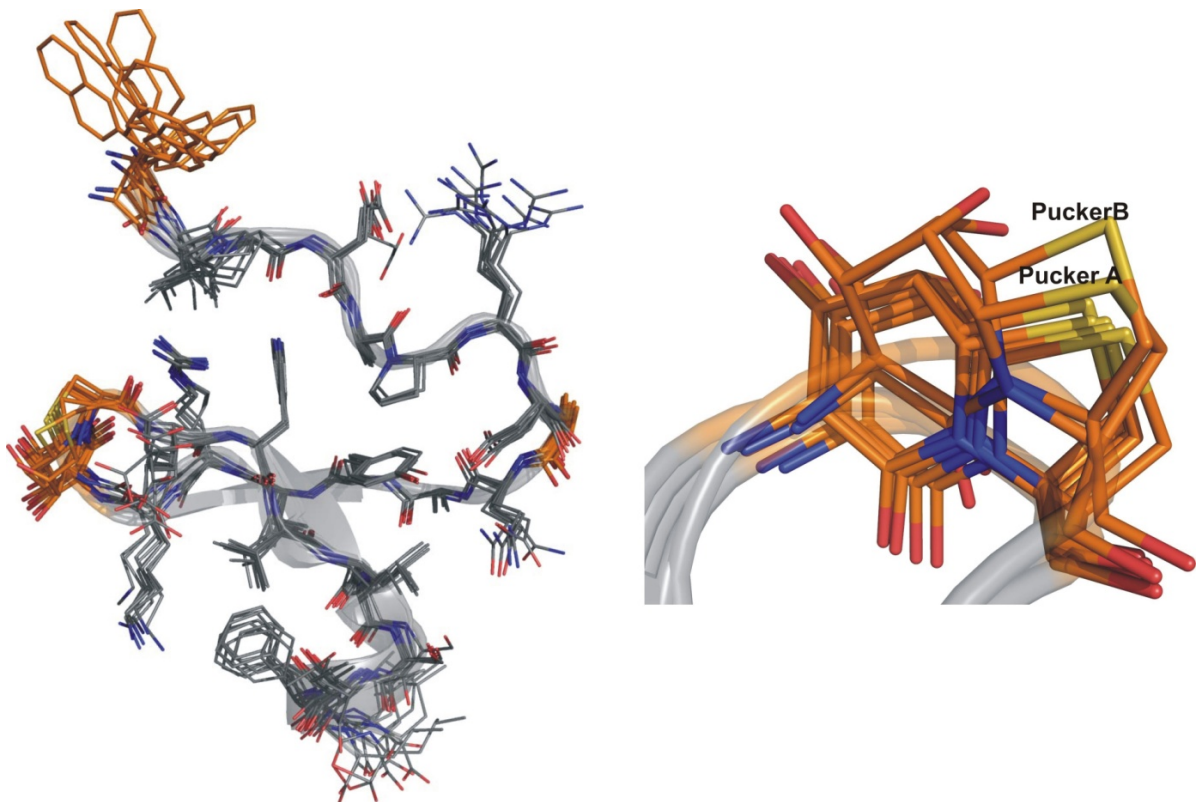


Abbildung 136 Links: Überlagerung der sechs Foldone aus einer asymmetrischen Einheit, rechts: Vergrößerung des Bereichs der Dipeptidbausteine. Hier zeigt ein Foldon seitens der Konformation eine deutliche Abweichung von den übrigen fünf Monomeren, welche sich in der Ausbildung von zwei zusätzlichen Konformationen äußert (*Pucker A* und *B*).^[173]

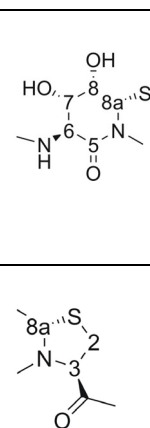
zeigt sich weiterhin, dass bestimmte Bereiche des Foldons beinahe keine Mikroinhomogenität zeigen. So ist beispielsweise die Seitenkette des Trp20 aufgrund der hydrophoben Wechselwirkung mit

anderen Foldonen des Trimers vollkommen invariabel, hingegen zeigen die in der Peripherie befindlichen Aminosäuren 2-Nal2 und Leu27 eine etwas stärkere Abweichung. Weiterhin zeigen sich verschiedene Konformere für den Dipeptidbaustein (Abbildung 136). Die Betrachtung der Dipeptidbausteine verdeutlicht, dass fünf davon eine sehr ähnliche Konformation zeigen, der Dipeptidbaustein aus Foldon c allerdings zeigt zwei Konformere, welche in Abbildung 136 als *Pucker A* und *Pucker B* bezeichnet worden sind.

Eine lokale Betrachtung der Konformation zeigt, dass alle Sechsringe eine *envelope*-Konformation einnehmen, dabei befinden sich die Atome 8a-4-5-6-7 in einer Ebene und der Kohlenstoff an Position 8 weist nach unten (E_8). Diese Konformation wird auch von den beiden abweichenden Dipeptidbausteinen eingenommen. Seitens der Thiazolidine zeigen die fünf übereinstimmenden Pli=Cat ebenfalls eine *envelope*-Konformation, hierbei liegen die Atome 3-4-8a-S in einer Ebene und der Kohlenstoff der Position 2 zeigt nach unten (E_2). Grundsätzlich zeigt *Pucker A* ebenfalls eine E_2 Konformation des Fünfrings, allerdings ist diese sehr viel stärker ausgeprägt als bei den übereinstimmenden Thiazolidinen. *Pucker B* hingegen zeigt ein E_1 Konformation, also das Schwefelatom des Thiazolidins weist nach unten, während die Atome 2-3-4-8a in einer Ebene liegen. In Tabelle 11 sind nochmals alle Dieder-Winkel der Dipeptidbausteine aufgelistet. Da auch die übereinstimmenden Foldone eine Mikroinhomogenität zeigen, ist zusätzlich deren Mittelwert angegeben.

Tabelle 11 Auflistung aller Torsionswinkel des Dipeptidbaustein der sechs Foldone in der Einheitszelle sowie des Mittelwerts der übereinstimmenden Foldone.

Torsion	Übereinstimmende Foldone					Mittelwert	<i>Pucker A</i>	<i>Pucker B</i>
Foldon	a	b	d	e	f	a,b,d,e,f	c	
8a-3a-5-6	5.1	5.0	7.2	1.9	7.3	5.3	3.8	1.8
3a-5-6-7:	-0.8	-2.8	-4.4	-5.3	-6.2	-3.9	-0.6	-4.3
5-6-7-8:	28.6	31.2	31.4	37.8	33.5	32.5	29.3	34.6
6-7-8-8a:	-57.8	-60.7	-58.9	-64.6	-62	-60.8	-61.0	-91.3
7-8-8a-3a:	61.6	62.4	59.9	58.1	63.2	61.04	59.0	81.4
8-8a-3a-5	-36.4	-35.0	-35.9	-30.0	-35.8	-34.6	-33.4	-28.3
3-3a-8a-S	20.1	20.8	20.5	21.1	20.0	20.5	30.8	23.8
3a-8a-S-2:	7.3	7.1	7.6	8.3	8.7	7.8	11.9	-36.5
8a-S-2-3:	-30.3	-30.5	-31	-33.5	-32.6	-31.58	-4.0	37.8
S-2-3-3a:	45.1	46.1	45.9	49.5	46.2	46.56	63.7	-31.1
2-3-3a-8a	-43.4	-44.7	-44.3	-44.3	-44.0	-44.1	-64.6	3.9



Damit zeigt sich, dass Pli=Cat zwar eine Vorzugskonformation besitzt, jedoch ein gewisses Abweichen von dieser Konformation seitens des Thiazolidins möglich ist, sofern die strukturellen Gegebenheiten

dies fordern. Weiterhin zeigt sich aber auch, dass trotz der konformativen Veränderung der β -turn an den Positionen 17 und 18 erhalten bleibt.

Die zuvor bereits erwähnten konformativen Abweichungen seitens des Dipeptidbausteins sind wahrscheinlich auf Wasserstoffbrücken mit weiteren Foldonen innerhalb des Trimers zurückzuführen. Dabei tritt Pli=Cat mittels seiner freien Hydroxylgruppen, dem Carbonyl an C5 sowie dem Amid an C6 mit einem benachbarten Foldon in Wechselwirkung (Abbildung 137). Diese Wechselwirkungen können direkt sein, wie zwischen der 7-OH und dem Amid des D-Ala10, oder sie sind durch Wassermoleküle verbrückt. So zu erkennen zwischen dem Amid des Dipeptidbausteins und dem Carbonyl von Gln11, zwischen dem Carbonyl an C5 und dem Amid von Ala6 oder der 8-OH und dem Carbonyl von Ala6.

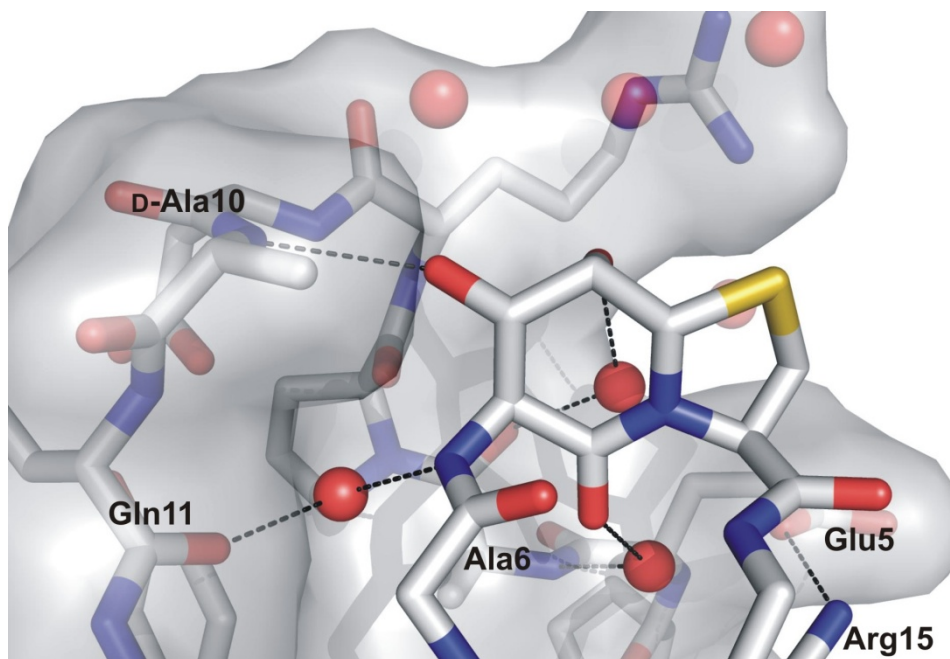


Abbildung 137 Dargestellt ist der Dipeptidbaustein des Foldons b sowie einzelne Reste des Foldons c. Die Seitenketten von Foldon b wurden der Übersichtlichkeit halber entfernt. Die Wassermoleküle, denen keine verbrückende Aufgabe zukommt, sind teiltransparent dargestellt. Neben den verbrückenden Wechselwirkungen von Pli=Cat ist weiterhin die Salzbrücke zwischen Arg15 (Foldon b) und Glu5 (Foldon c) gezeigt.

Neben den bereits erwähnten Wechselwirkungen zweier monomerer Foldon-Einheiten eines Trimers über den Dipeptidbaustein ist in Abbildung 137 beispielhaft die Salzbrücke zwischen Glu5 des Foldons c und Arg15 des Foldons b gezeigt. Die Abstände der der soeben erwähnten Wechselwirkungen betragen 3.0 Å für die Wasserstoffbrücke der 7-OH und dem D-Ala10, 2.7-3.0 Å für die verbrückten Wechselwirkungen sowie 2.8 Å für die Salzbrücke zwischen Glu5 und Arg15.

Für die Stabilisierung der Trimer-Packung kann unter anderem die Salzbrücke zwischen Lys16 (Foldon e) des einen Trimers und Glu19 (Foldon a) des anderen Trimers herangezogen werden. Diese ist in Abbildung 138 dargestellt, zu erkennen ist die angedeutete Salzbrücke zwischen den beiden Trimeren.

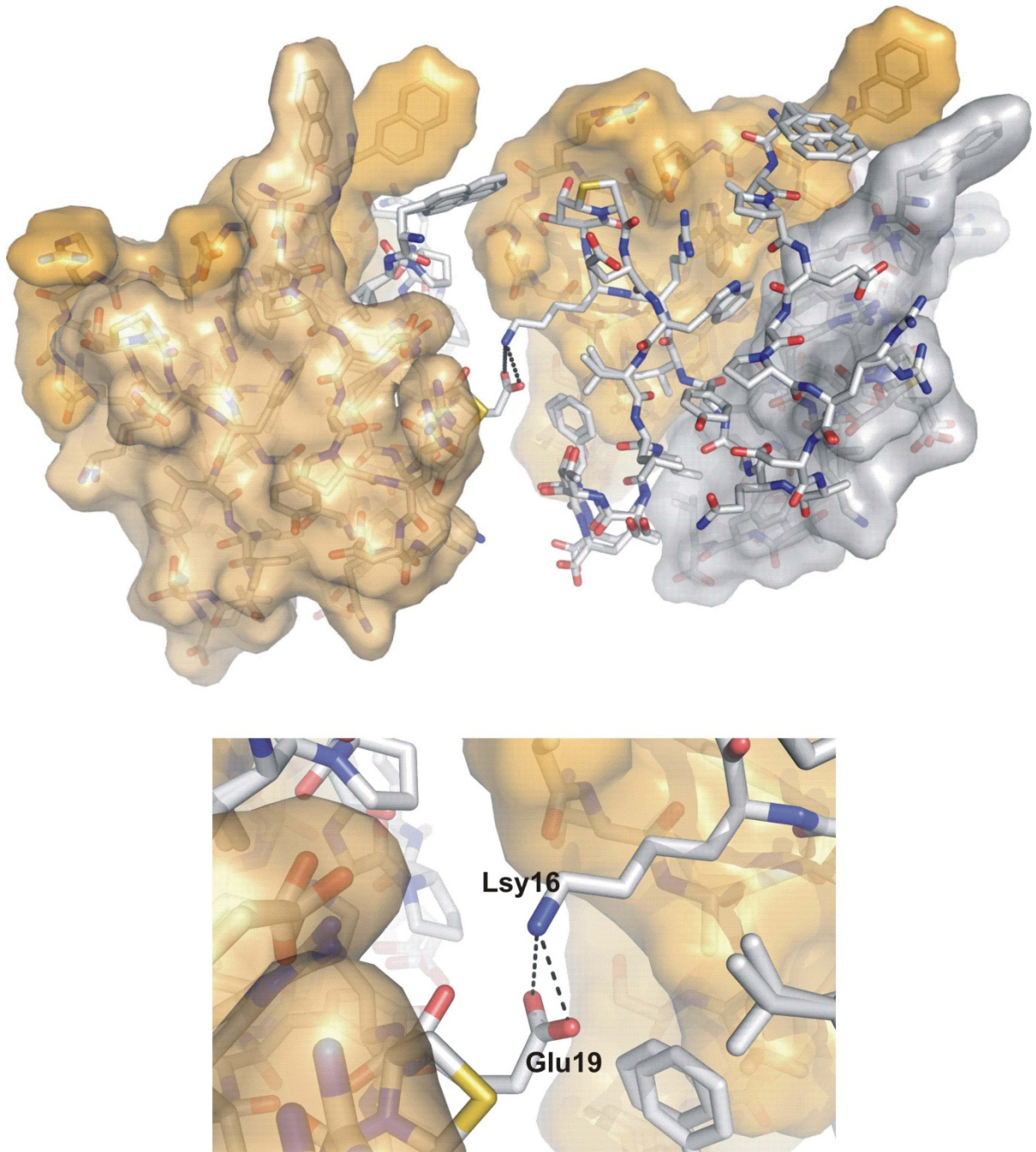


Abbildung 138 Wechselwirkung zwischen den Trimeren a und e über eine Salzbrücke zwischen Glu19 (Foldon a) und Lys16 (Foldon e). Der Abstand der bidentalen Salzbrücke beträgt 2.9 bzw. 3.5 Å.

4.5.2 Struktur des [D-Ala¹⁰, D-Phe¹⁷]-Foldons

Ähnlich dem vorherigen Foldon wurden die Kristalle der Verbindung **(76)** ebenfalls unter Niedrigsalzbedingungen aus wässriger Lösung erhalten, allerdings zeigte sich, dass hier die Raumgruppe *P*32 anstelle von *P*1 vorlag. Die Auflösung dieses Datensatzes beträgt 0.98 Å. Im Gegensatz zur vorherigen Struktur findet sich nur eine Ausrichtung des Trimers in der asymmetrischen Einheit des [D-Ala¹⁰, D-Phe¹⁷]-Foldons (Abbildung 139).

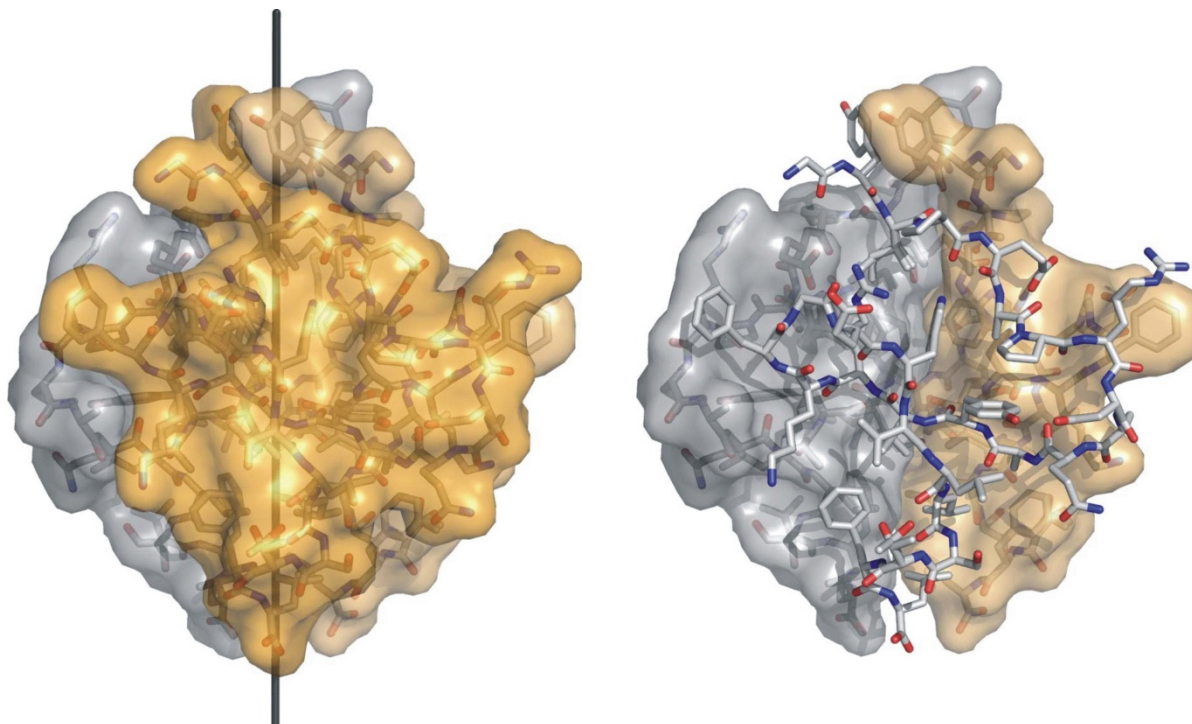


Abbildung 139 Übersicht der erhaltenen Struktur der Verbindung **(76)**. Links: Trimer mit eingezeichneter C₃-Symmetrieachse, rechts: Abbildung eines Foldons vor der Oberfläche der beiden anderen, zum Trimer gehörende, Foldone.

Weiterhin unterscheidet sich die Struktur des [D-Ala¹⁰, D-Phe¹⁷]-Foldons von der Verbindung **(72)** dadurch, dass kaum Mehrfachkonformationen beobachtet werden können, wie sie in Abbildung 135 dargestellt sind.

Entsprechend der vorherigen Struktur erlaubt die sehr hohe Auflösung des Datensatzes auch in diesem Fall die exakte Positionierung aller Atome. Die Betrachtung der Elektronendichte zeigt deutlich die Genauigkeit der bestimmten Struktur. In Abbildung 140 ist die Gesamtstruktur sowie die Vergrößerung der relevanten Modifikationen und der dazugehörigen Elektronendichte abgebildet. Anders als Pli=Cat zeigt die D-Phe17-Gly18 Sequenz eine geringere Wechselwirkung mit dem Peptidrückgrat des nächsten Foldons innerhalb des Trimers.

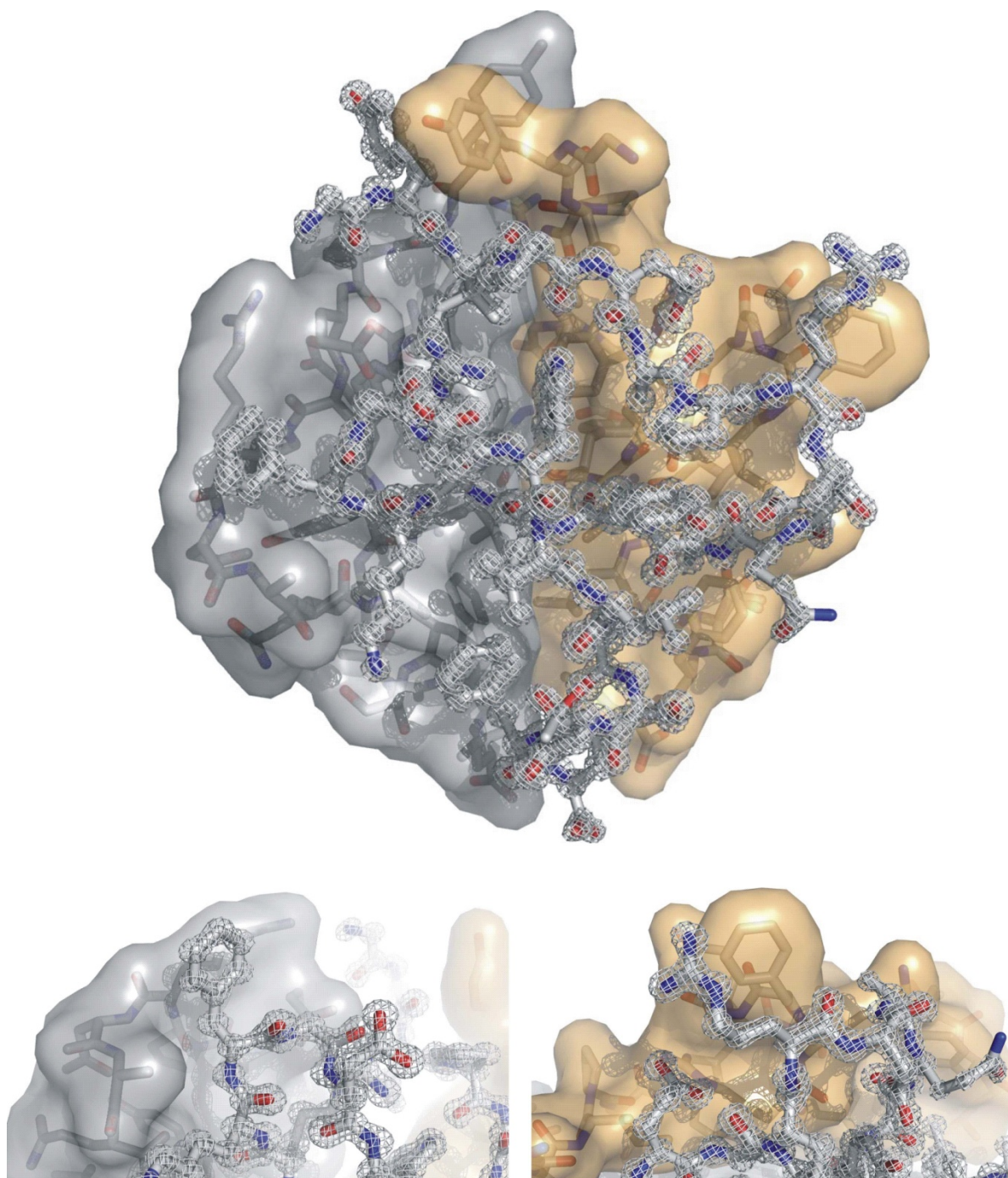


Abbildung 140 Darstellung der Elektronendichte des [D-Ala¹⁰, D-Phe¹⁷]-Foldons. Oben: Gesamtansicht, unten Darstellung der Elektronendichte der Modifikationen, links D-Phe¹⁷, rechts D-Ala¹⁰. Dargestellt ist die Elektronendichte $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$, der Konturierungslevel der Abbildungen beträgt $1/\sigma = 2$.

Die Betrachtung der drei Trp20, die sich im Zentrum des Trimers befinden, verdeutlicht den Hohlraum, der sich zwischen den drei hydrophob wechselwirkenden Indolen ausbildet. Bei einem durchschnittlichen Abstand von 4.3 Å der Indole ergibt sich daraus ein Raumvolumen von etwa 65 Å³. In Abbildung 141 ist der zuvor beschriebene Hohlraum dargestellt und die drei Seitenketten der Trp20 gekennzeichnet. Das Vorhandensein dieses Freiraums konnte genauso beim [ΔGly¹, NaI², D-Ala¹⁰, Pli¹⁷=Cat¹⁸]-Foldon sowie bei den literaturbekannten Beispielen nachgewiesen werden und ist nicht sequenzspezifisch für die Verbindung **(76)**.

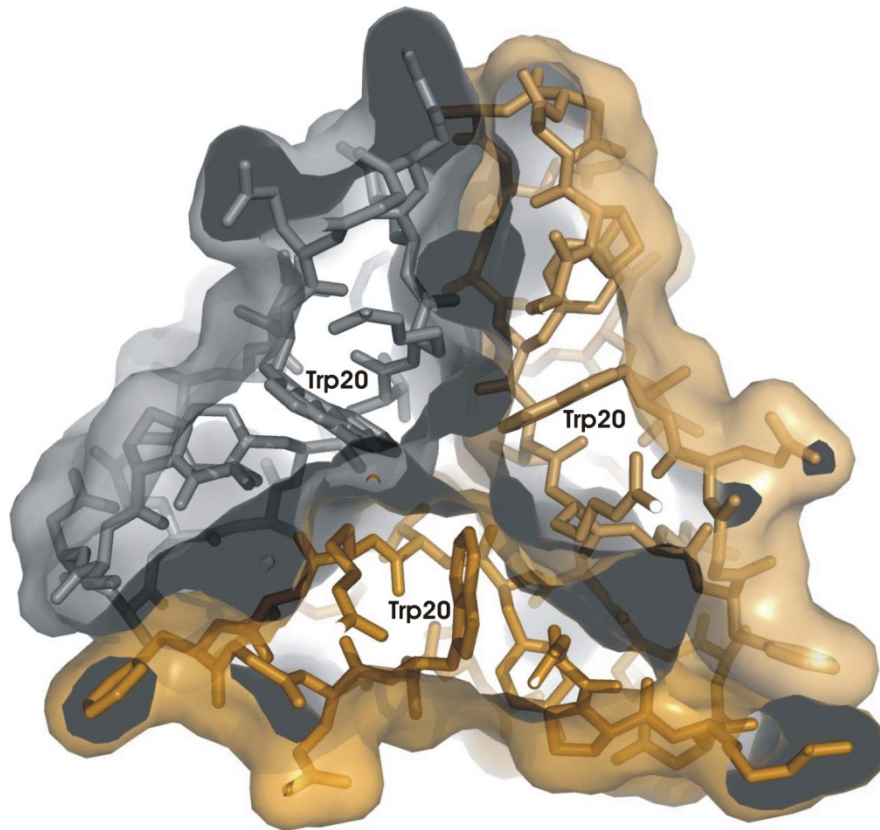


Abbildung 141 Aufsicht auf das Trimer. Die teiltransparenten Oberflächen der Foldone deuten den Hohlraum innerhalb des Trimers an.

Der Vergleich der beiden vorliegenden Strukturen seitens der Schleifenstrukturen zeigt, dass zwei verschiedenen Arten von β -turn vorliegen. Sehr einfach zeigt sich dies bereits an der Ausrichtung der Carbonyle der $i+1$ ten Position. Durch Auslesen der Torsionswinkel ϕ und φ (Tabelle 12) ist es weiterhin möglich eine Klassifizierung vorzunehmen.^[11] So zeigt das [D-Ala¹⁰, D-Phe¹⁷]-Foldon entsprechend dem Wildtyp einen β I'-turn während das [Δ Gly¹, Nal², D-Ala¹⁰, Pli¹⁷=Cat¹⁸]-Foldon einen β II'-turn ausbildet. Die Abbildung 142 zeigt nochmals beide Turns der Foldone sowie die zur Klassifizierung notwendigen Torsionswinkel.

Tabelle 12 Auflistung der Torsionswinkel der Aminosäuren an den Positionen der β -turns sowie der α - α -Abstand der Aminosäuren i und $i+3$.

	ϕ_i	φ_i	ϕ_{i+1}	φ_{i+1}	
[D-Ala ¹⁰ , D-Phe ¹⁷]	-153.1	125.5	52.2°	46.3°	
[Δ Gly ¹ , Nal ² , D-Ala ¹⁰ , Pli ¹⁷ =Cat ¹⁸]	-123.7	109.9	50.3°	-133.1°	
	ϕ_{i+2}	φ_{i+2}	ϕ_{i+3}	φ_{i+4}	$\alpha_i \rightarrow \alpha_{i+3}$
[D-Ala ¹⁰ , D-Phe ¹⁷]	71.0°	18.6°	-139.1	159.7	5.44 Å
[Δ Gly ¹ , Nal ² , D-Ala ¹⁰ , Pli ¹⁷ =Cat ¹⁸]	-96.6°	28.7°	-136.5	153.7	5.42 Å

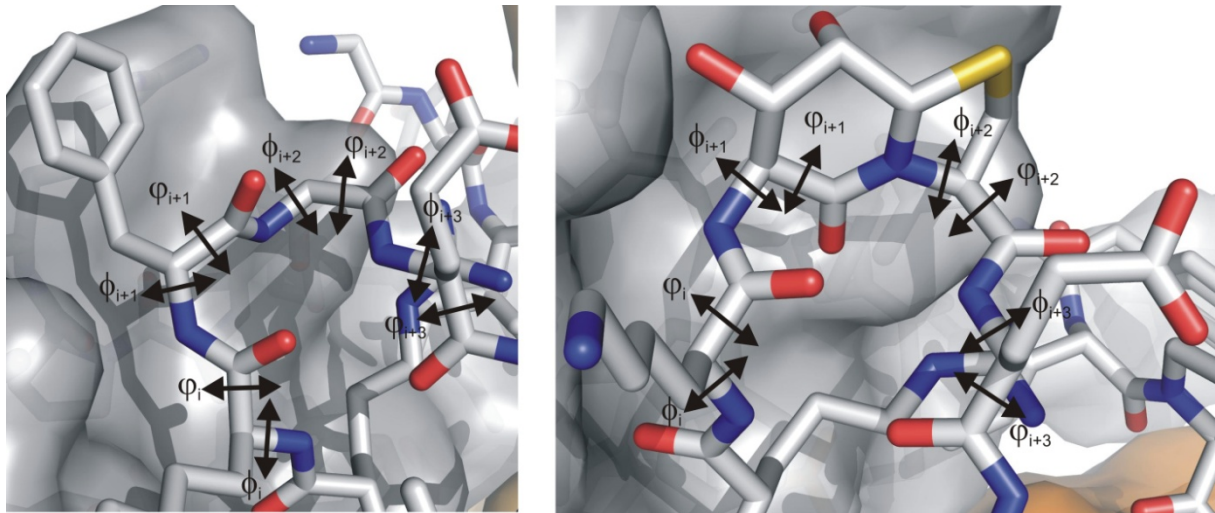


Abbildung 142 Darstellung der beiden β -turns sowie der Winkel, die für die Klassifizierung notwendig sind. Bereits die Ausrichtung des Carbonyls deutet an, dass zwei verschiedenen Arten von Turn vorliegen müssen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass hochaufgelöste Datensätze der beiden Foldone erhalten werden konnten, anhand derer die vollständige Strukturaufklärung der Verbindungen möglich war. Durch die sehr gute Auflösung von 1.06 bzw. 0.98 Å war es möglich selbst geringfügige konformative Unterschiede nachzuweisen und so eine sehr hohe Präzision seitens der Wiedergabe der Struktur zu erreichen.

Erstmals wurden Kristallstrukturen hybrider Proteine erhalten, in denen ein Dipeptidmimetikum eingesetzt wurde. Die nähere Betrachtung von Pli=Cat im Zusammenhang mit der Umgebung in einem Protein lieferte aufschlussreiche Ergebnisse. Es konnte gezeigt werden, dass der Dipeptidbaustein unter anderem durch die Hydroxylgruppen verbrückende Wechselwirkungen mit anderen Foldonen eines Trimers eingeht.

Anhand der Torsionswinkel ϕ und ψ war es möglich, die auftretenden β -turns sicher zu klassifizieren. Dabei zeigte sich, dass Pli=Cat trotz des β II'-turns, welcher durch die Geometrie des Dipeptidbausteins festgelegt war, als Mimetikum für einen β I'-turn fungieren konnte. Die Substitution eines β -turn-Typs gegen einen Anderen stellt ebenfalls eine Neuerung dar, welche in dieser Art noch nicht beobachtet werden konnte und wirft Fragen seitens der idealen Anordnung für eine Schleifenstruktur auf.

Obwohl eine sehr hohe konformative Stabilität des Mimetikums nachgewiesen werden konnte, wurden verschiedenen Ringkonformationen des Dipeptidbausteins beobachtet, welche daraufhin deuten, dass dieser in engen Grenzen anpassungsfähig ist, sich aber nicht aus der eigentlichen Turn-Konformation heraus verformen lässt.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war es möglich, ein neues β -turn-Mimetikum, Pli=Cat (Abbildung 143), zu synthetisieren und erfolgreich in Proteinstrukturen einzubringen. Von verschiedenen derartig modifizierten hybriden Proteinen konnten Kristalle erhalten werden, wodurch es erstmals möglich war, die konformative Auswirkung eines Mimetikums im Kontext eines Proteins zu untersuchen. Abbildung 143 zeigt die monomere Untereinheit des kristallisierten Proteins (**76**) mit den hervorgehobenen Substitutionen.

Neben der Verfügbarkeit im Multigrammaßstab und der hohen konformativen Stabilität zeichnet sich Pli=Cat weiterhin durch seine besonders einfache Handhabung während der Kupplung in Lösung genauso wie in der automatisierten

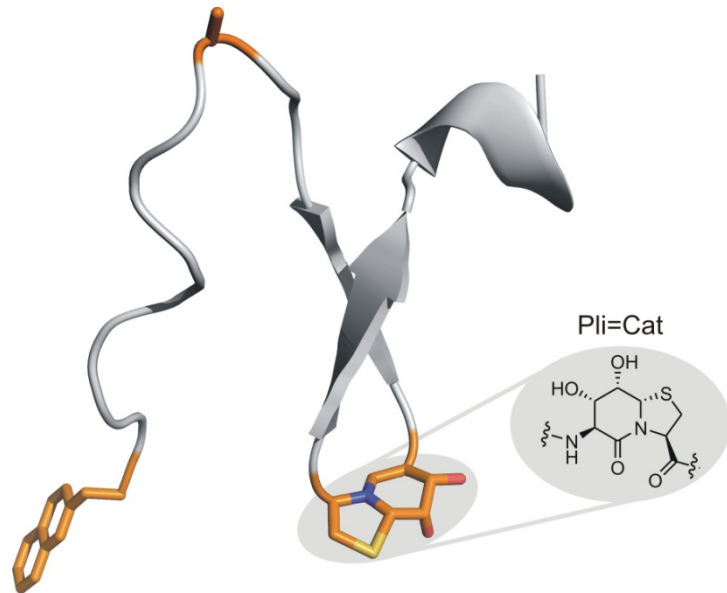


Abbildung 143 Darstellung eines einzelnen Peptids der Foldon-Mutante (**76**). Hervorgehoben sind die Substitutionen (orange) sowie die Struktur der Dipeptidmimetikums Pli=Cat.

Festphasensynthese aus. Mittels zyklischer Modellpeptide konnte der Nachweis erbracht werden, dass Pli=Cat aktiv an der Strukturgebung beteiligt ist und in jeder bisher untersuchten Struktur einen β -turn induziert. Verglichen mit literaturbekannten Beispielen, von denen bisher keines in einem kristallinen Protein untersucht werden konnte, hebt sich der Dipeptidbaustein deutlich ab. Es konnte durch die direkte Gegenüberstellung mit Btd eindrucksvoll der Vorteil von Pli=Cat seitens der Induktion eines β -turns gezeigt werden. Dabei konnte herausgearbeitet werden, dass Btd selbst nicht in der Lage ist, einen β -turn zu bilden, sondern aufgrund seiner Flexibilität auf äußere strukturgebende Einflüsse angewiesen ist, wohingegen Pli=Cat selbständig einen β -turn ausbildet. Die erfolgreiche Verwendung von Pli=Cat in medizinisch-chemisch relevanten Verbindungen, wie dem Somatostatin oder einer Sequenz des *Alzheimer*-Peptids, belegen weiterhin die Funktionalität sowie das breite Spektrum von Anwendungsmöglichkeiten des Dipeptidbausteins. So konnte in der C-terminalen Sequenz des *Alzheimer*-Peptids, welche im nativen Zustand als gestrecktes β -Faltblatt vorliegt, durch Pli=Cat erstmals eine Schleifenstruktur induziert werden.

Die bereits erwähnten hybriden Proteinstrukturen konnten durch Mutationen des Foldons, einer Trimerisierungsdomäne der T4-Phage, dargestellt werden. Die Eigenschaft des Foldons, mittels sehr schneller Faltung von drei einzelnen Peptidsequenzen extrem stabile Trimere auszubilden, war für

die Wahl dieser Verbindung als Synthesziel ausschlaggebend. Da die Größe der einzelnen Sequenzen festphasensynthetisch gut zugänglich war, konnten durch die Faltung und Trimerisierung von Peptiden, deren Größe zwischen 26 und 41 Aminosäuren lag, bereits Proteine in der Größenordnung von 78 bis 123 Aminosäuren dargestellt werden. Insgesamt gelang die Synthese 24 verschiedener Mutanten des Foldons; dabei war es zum Einen möglich, mittels NMR-Spektroskopie zu bestimmen, ob eine Proteinfaltung seitens der Foldone möglich war und zum Anderen deren strukturelle Stabilität einzuschätzen. Weiterhin konnten durch die Mutationen faltungsrelevante Bereiche sowie Möglichkeiten zur Stabilisierung der Trimere herausgearbeitet werden. Die Substitution des nativen β I'-turns im Foldon gegen Pli=Cat schränkte die Beweglichkeit des Peptidrückgrats durch die zusätzliche Stabilisierung so stark ein, dass erstmals Kristalle des isolierten Trimers erhalten werden konnten. Die Kristallisationsneigung der Foldone war so hoch, dass insgesamt vier verschiedene Derivate Kristalle ausbildeten. Die Betrachtung von Pli=Cat im Zusammenhang mit komplexen Proteinstrukturen zeigte, dass der nativ auftretende β I'-turn des Foldons durch den β II'-turn des Pli=Cat ersetzt werden konnte ohne die Proteinfaltung erheblich zu beeinflussen. Weiterhin zeigte sich durch das Auftreten von Mikroinhomogenitäten der einzelnen Foldone innerhalb der

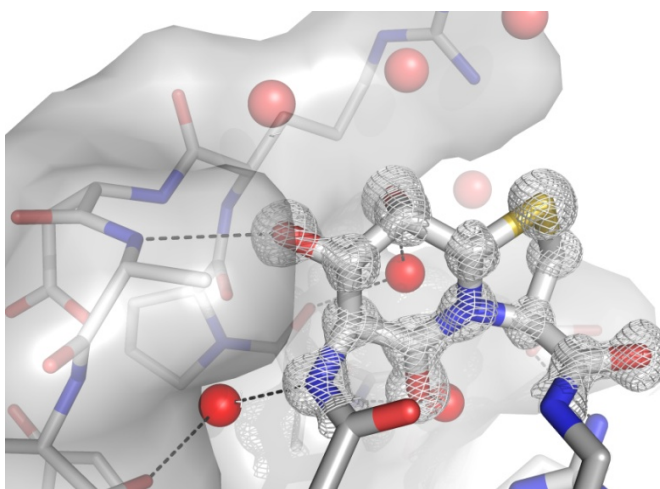


Abbildung 144 Darstellung der verbrückenden Wechselwirkung von Pli=Cat mit dem Peptidrückgrat eines anderen Foldons innerhalb des Trimers. Weiterhin ist die Elektronendichte am Dipeptidbaustein sowie die an der weiteren Verbrückung innerhalb des Trimers teilnehmenden Wasser-Moleküle gezeigt.

asymmetrischen Einheit sowie durch die verschiedenen Konformationen, die der Dipeptidbaustein in den Foldonen einnehmen konnte, dass dieser trotz seiner hohen konformativen Rigidität in der Lage ist, sich in einem notwendigen Maß seiner Umgebung anzupassen. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass der Dipeptidbaustein durch direkte, genauso wie durch Wassermoleküle vermittelte Wasserstoffbrücken in Wechselwirkung mit anderen Foldonen innerhalb eines Trimers stand und so einen stabilisierenden Beitrag zur Struktur leistete (Abbildung 144).

Zusammenfassend wurde ein Dipeptidmimetikum ausgehend von D-Ribose und L-Cystein dargestellt und im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich in Peptiden und Proteinen bis zu einer Größe von 13 kDa eingesetzt. Durch weitreichende Untersuchungen konnten die Vorteile seitens Synthese, Lagerung und Handhabung deutlich herausgearbeitet werden.

6 Experimenteller Teil

6.1 Allgemeine Anmerkungen

Lösungsmittel / Reagenzien

Die verwendeten Lösungsmittel wurden entsprechend Standardmethoden aufgereinigt. Absolute Lösungsmittel wurden über Molsieb gelagert. DCM wurde über Calciumhydrid und THF über einer Na/K-Legierung getrocknet. „DMF für die Peptidsynthese“ wurde von *Iris-Biotech* kommerziell erworben.

Dünnschichtchromatographie:

Es wurden Aluminium-DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F254 der Firma *Merck* verwendet. Die Detektion erfolgte durch UV-Absorption/Fluoreszenzauslöschung unter einer UV-Lampe ($\lambda = 254 \text{ nm}$) oder durch die Verwendung verschiedener Färbereagenzien.

Die entsprechenden Farbreaktionen der verschiedenen Färbereagenzien wurden durch eintauchen in die jeweilige Lösung und anschließendes Erwärmen mit einem Heißluftföhn bei etwa 350°C hervorgerufen.

Mostain-Lsg.: 10.0 g Ammoniummolybdat und 0.20 g Cer(IV)sulfat in 200 mL 10%iger H_2SO_4

Ninhydrin-Lsg.: 1.00 g Ninhydrin in 100 mL Ethanol

Flashchromatographie:

Als stationäre Phase diente Kieselgel 60 (Korngröße 0.040-0.063 mm) der Firma *Merck*. Eluiert wurde bei Raumtemperatur unter Normaldruck bzw. unter Zuhilfenahme eines Druckluftanschlusses.

Kernresonanzspektroskopie:

Die NMR-Spektren wurden an den folgenden Geräten aufgenommen:

Bruker AV 300 (300.13 MHz) für ^1H -Routinemessungen

Bruker DRX 500 für ^1H (500.13 MHz), ^{13}C (125.76 MHz) und 2D-Spektren

Bruker DRX 600 für ^1H (600.13 MHz), ^{13}C (150.9 MHz) und 2D-Spektren

Die Messungen am *DRX 600* sowie am *DRX 500* wurden durch Mitarbeiter der NMR-Abteilung bzw. selbständig durchgeführt. Die chemischen Verschiebungen (δ) sind in *parts per million* (ppm) angegeben und wurden aus der Mitte des Kopplungsmusters abgelesen. Die Kopplungskonstanten sind in Hertz (Hz) angegeben. Gemessen wurde bei einer Standardtemperatur von 300 K falls nicht anders im Spektrum vermerkt. Als interner Standard diente das Resonanzsignal des verwendeten Lösungsmittels (DMSO_{d6} : ^1H : $\delta = 2.50 \text{ ppm}$, ^{13}C : $\delta = 39.52 \text{ ppm}$; CDCl_3 : ^1H : $\delta = 7.26 \text{ ppm}$,

^{13}C : $\delta = 77.16$ ppm; $\text{MeOH}_{\text{d}4}$: ^1H : $\delta = 3.31$ ppm; D_2O : ^1H : $\delta = 4.79$ ppm). Ist im Spektrum ein Signal für Wasser zu erkennen, so wurde dies nicht markiert (H_2O : $\text{DMSO}_{\text{d}6}$: ^1H : $\delta = 3.33$ ppm; CDCl_3 : ^1H : $\delta = 1.56$ ppm; $\text{MeOH}_{\text{d}4}$: ^1H : $\delta = 4.79$ ppm).

Die Angaben im Bezug auf die Signalform sind phänomenologisch, d.h. sie entsprechen dem Erscheinungsbild des jeweiligen Signals und nicht der theoretisch zu erwartenden Multiplizität (abgelesen wurde dies, ebenso wie die Kopplungskonstanten, aus den Lorentz-zu-Gauß transformierten ^1H -NMR-Spektren). Konnten diastereotope Protonen zugeordnet werden, wurden diese mit $^{\text{proS}}$ bzw. $^{\text{proR}}$ gekennzeichnet. Abkürzungen: s Singulett, d Dublett, dd Doppeldublett, t Triplett, q Quartett, m Multipllett, bs breites Signal.^[174, 175]

Massenspektrometrie:

Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte durch Mitarbeiter der Massenspektroskopischen Abteilung an einem *Thermo Fischer Scientific Finnigan LTQ-FT* und *Bruker Biflex III Maldi-TOF*.

Schmelzpunkt:

Die Schmelzpunktbestimmung erfolgte bei Schmelzpunkten > 120 °C an einem *Koffler-Heiztisch* bzw. bei Schmelzpunkten < 120 °C an einem *Stuart*® SMP10. Der jeweilige Schmelzpunkt wurde durch Doppelbestimmung ermittelt, und stellt den Mittelwert der beiden Messungen dar.

Infrarotspektroskopie:

Die IR Spektren wurden an einem *Interferometer IFS 88* der Firma *Bruker* durch Mitarbeiter der IR-Abteilung gemessen bzw. durch Eigenmessung an einem *Bruker Alpha-P FT-IR-Spektrometer* erhalten.

Drehwert:

Die Drehwerte wurden an einem *Perkin-Elmer 241 Polarimeter* bestimmt. Die Drehwerte α_{λ}^T sind in $[\text{mL} (\text{mg}\cdot\text{dm})^{-1}]$ bei der Wellenlänge λ und der Temperatur T angegeben. Die Küvettenlänge betrug jeweils 1 dm. Als Lösungsmittel wurden *Uvasol*® MeOH und *Uvasol*® CHCl_3 der Firma *Merck* verwendet.

CHN-Analysen:

Die CHN-Analysen wurden routinemäßig an einem *Heraeus CHN-Rapid* durch die Mitarbeiter der Service-Abteilung durchgeführt.

Röntgenbeugungsuntersuchungen:

Die Experimente wurden an einem *IPDS2-Diffraktometer* unter Verwendung einer Wellenlänge von 0.71073 Å von Mitarbeitern der Röntgenabteilung durchgeführt.

Die Röntgenstrukturdaten der Proteinkristalle wurden an der ID23-1 der ESRF in Grenoble durch H. W. Grosse aufgenommen. Die Lösung der Kristallstrukturen erfolgte die Arbeitsgruppe *Essen*.

CD-Spektroskopie:

Die CD-Spektren wurden selbständig an einem *JASCO J-810* Spektropolarimeter aufgenommen, welches mit einem thermostatisierten Probenhalter ausgestattet und mit einem PC zur Signalaufnahme und Prozessierung verbunden war. Die Weglänge der verwendeten Quarzküvetten betrug 0.1 cm. Es wurde der Durchschnitt von wenigstens fünf Messungen in der Einheit [mdeg] angegeben. Für das Aufschmelzen der Foldon-Trimere wurde die Intensität des Indol-Signals bei einer Wellenlänge von 218 nm verfolgt.

HPLC:

Analytische HPLC-Läufe erfolgten selbständig an einer Dionex-Anlage mit Diodenarraydetektor und einer „Dionex P680 dual gradient pump“. Die Spezifikationen der Säule lauteten wie folgt: Dionex Acclaim 120, C18, 5 µm, 120 Å, 4.6 x 150 mm. Die Messungen wurden bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 0.6 mL pro Minute durchgeführt

Präparative HPLC-Läufe wurden in Zusammenarbeit mit Dr. U. Linne an einer Agilent 1100 HPLC durchgeführt. Bei der verwendeten Säule handelte es sich um eine Phenomenex Luna C18 (2), 10 µm, 250 mm x 21.2 mm.

Automatisierte Festphasensynthese:

Die Automatisierte Festphasensynthese erfolgte selbständig an einem *Advanced Chemtech APEX 396* Peptid-Synthesizer.

6.2 Allgemeine Protokolle für die Festphasensynthese

6.2.1 Beladen von 2-Cl-2-Tritylharz

Ausgehend von 2-Cl-2-Tritylharz erfolgte die Beladung des Harzes mit der ersten Fmoc-geschützten Aminosäure nach dem folgenden Protokoll.

- 10 min Quellen in DMF
- 120 min Beladen mit 1.2 eq Fmoc-AS-OH, 4.0 eq DIPEA in DCM (10 mL/1 g Harz)
- Waschen mit DCM (3x)
- 2x 10 min Cappen mit DCM/MeOH/DIPEA 80/15/5
- Waschen mit DMF (3x) anschließend DCM (3x)
- 30 min Stehen in DCM
- Trocknen am Hochvakuum

Zur Bestimmung der Beladung des Harzes wurde eine Probeabspaltung durchgeführt und diese mittels UV vermessen. Dazu wurde eine exakt bestimmte Menge an Harz eingewogen (ca. 1.0 mg) und mit 1.0 mL 20%igen Piperidin-Lösung für eine halbe Stunde behandelt. Anschließend wurde mit 9.0 mL Methanol verdünnt und die Absorption der Lösung bei den Wellenlängen 300 nm und 289 nm bestimmt.

(Formel 1)
$$n = \frac{V \cdot A \cdot 10}{\epsilon \cdot d \cdot m}$$

- V: Gesamtvolumen (ml)
- A: Absorption
- ϵ : Extinktionskoeffizient (300 nm: 7800, 289 nm: 5800) in ml/mmol·cm
- d: Schichtdicke der Küvette (cm)
- m: Menge an Harz (mg)

Über die in (Formel 1) gezeigte Gleichung konnte die Beladung des Harzes in mmol/g Harz durch Bildung des Mittelwertes der Werte für 300 und 289 nm berechnet werden.

6.2.2 Festphasenprotokoll I

Nachfolgend soll das Standardprotokoll für die Synthese eines Peptids mittels automatisierter Festphasensynthese aufgezeigt werden. Die Standardmäßige Ansatzgröße betrug 0.1 mmol, wurden größere Mengen eines Peptids benötigt, so musste der jeweilige Ansatz mehrfach gleichzeitig durchgeführt werden. Das Protokoll der Festphasensynthese wurde im Rahmen der Doktorarbeit hinsichtlich der eigenen Bedürfnisse modifiziert, Änderungen sind im Folgenden mit (→) gekennzeichnet.

- a. Quellen in 2.5 mL DMF für 60 min (→ 15 min)
- b. 2x Entschützen mit 2.0 mL 20%iger Piperidin-Lösung für je 15 min (→ 10 min)
- c. 5x Waschen mit 2.0 mL DMF
- d. 5x Waschen mit 2.0 mL DCM
- e. Quellen in 2.5 mL DMF für 60 min (→ 15 min)
- f. Kuppeln mit 3.0 eq HBTU/HOBt/Fmoc-AS für 60 min
- g. 2x Waschen mit 0.4 mL DMF
- h. Kuppeln mit 3.0 eq HBTU/HOBt/Fmoc-AS für 60 min (→ 1.0 eq für zweite Kupplung)
- i. 2x Waschen mit 0.4 mL DMF

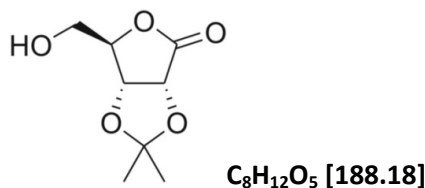
Der automatisierte Zyklus wiederholte sich zwischen den Schritten b. - i., bis das gewünschte Peptid dargestellt worden war.

6.2.3 Festphasenprotokoll II

Wurde nur ein einzelnes, relativ kurzes Peptid benötigt, so wurde diese Synthese am Harz von Hand in einer Glasfritte durchgeführt. Dabei war die Ansatzgröße nicht auf 0.1 mmol festgelegt, was es erlaubte auch größere Mengen eines Peptids in einem einzigen Ansatz darzustellen. Seitens der eigentlichen Synthese bestand kein Unterschied zu dem unter **Festphasenprotokoll I** beschriebenen Verfahren. Allerdings konnte nicht die Genauigkeit hinsichtlich der angegebenen Zeiten sowie der für das Waschen und Quellen verwendeten Lösungsmittelmengen erreicht werden. Weiterhin wurden Kupplungen, welche als weniger Effektiv angesehen wurden über einen längeren Zeitraum als die angegebenen 60 Minuten durchgeführt.

6.3 Beschreibung der Experimente

2,3-Isopropyliden-D-Ribonolacton (**1**)



Die Verbindung (**1**) wurde entsprechend [176] synthetisiert, die erhaltenen Daten stimmen mit den literaturbekannten Angaben überein.

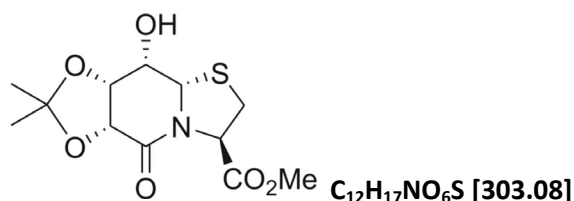
Schmp.: 135 °C.

¹H-NMR: (300 MHz, DMSO-*d*₆); δ = 5.31 ppm (t, ³*J*_{H,H} = 5.0 Hz, 1 H), 4.77 ppm (s, 1 H), 4.60 ppm (t, ³*J*_{H,H} = 2.1 Hz, 1 H), 3.64-3.60 ppm (m, 2 H), 1.35 ppm (s, 3 H), 1.31 ppm (s, 3 H).

¹³C-NMR: (75 MHz, DMSO-*d*₆); δ = 174.3 ppm, 111.6 ppm, 82.3 ppm, 78.1 ppm, 75.0 ppm, 60.4 ppm, 26.5 ppm, 25.1 ppm.

HRMS (ESI): für C₈H₁₂O₅ (M+Na⁺), ber.: 211.0577, gef.: 211.0578.

8a(S)H-(8S)-hydroxy-(6R,7R)-O-isopropyliden-5oxo-hexahydro-thiazolo[3,2-a]pyridin-3(R)-carbonsäure-methylester (**2**)



11.9 g (63.3 mmol, 1.0 eq) der Verbindung (**1**) wurden in 100 mL Acetonitril gelöst und mit 23.0 g (82.1 mmol, 1.3 eq) IBX versetzt. Der Ansatz wurde für zwei Stunden unter Rückfluss erhitzt, anschließend wurde für eine Stunde im Eisbad gekühlt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und mit 50 mL Acetonitril nachgewaschen. Das Filtrat wurde unter vermindertem Druck eingeeengt und der Rückstand am Hochvakuum getrocknet. Das erhaltene Öl wurde in 170 mL MeOH/Pyridin (7.5:1) gelöst und mittels Stickstoffeinleitung entgast, es erfolgte die Zugabe von 14.0 g L-Cysteinmethylester-HCl (81.9 mmol, 1.3 eq). Der Ansatz wurde für 14 Tage unter Stickstoffatmosphäre gerührt, anschließend erfolgte die Zugabe von zusätzlichen 2.80 g L-Cysteinmethylester-HCl (16.4 mmol, 0.25 eq). Es wurde daraufhin für zwei Tage auf 50 °C erhitzt, im Anschluss daran wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in 100 mL Essigsäureethylester sowie 50 mL Wasser aufgenommen. Die wässrige Phase wurde so oft mit Essigsäureethylester extrahiert, bis kein Produkt mehr mittels DC nachweisbar war. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen und auch diese wässrige Phase wurde mehrfach reextrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt,

wobei das Produkt als blass gelber Feststoff auskristallisierte. Nach dem Trocknen am Hochvakuum wurden 15.6 g (51.5 mmol, 82%) des Produkts erhalten.

Schmp.: 159.5 °C.

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃); δ = 5.67 ppm (dd, ³J_{3-H,2-H²proR} = 6.0 Hz, ³J_{3-H,2-H^{proS}} = 1.9 Hz, 1 H, 3-H), 4.86 ppm (s, 1 H, 8a-H), 4.66 ppm (d, ³J_{6-H,7-H} = 8.7 Hz, 1 H, 6-H), 4.55 ppm (dd, ³J_{7-H,6-H} = 8.7 Hz, ³J_{7-H,8-H} = 3.9 Hz, 1 H, 7-H), 4.17 ppm (d, ³J_{8-H,7-H} = 3.9 Hz, 1 H, 8-H), 3.76 ppm (s, 3 H, CO₂CH₃), 3.26 ppm (dd, ²J_{2-H^{proR},2-H^{proS}} = 11.1 Hz, ³J_{2-H^{proR},3-H} = 6.1 Hz, 1 H, 2-H^{proR}), 3.20 ppm (dd, ²J_{2-H^{proS},2-H^{proR}} = 11.0 Hz, ³J_{2-H^{proS},3-H} = 1.9 Hz, 1 H, 2-H^{proS}), 2.51 ppm (bs, 1 H, 8-OH), 1.57 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃^t), 1.45 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃^h).

¹³C-NMR: (125 MHz, CDCl₃); δ = 170.0 ppm (CO₂CH₃), 166.6 ppm (5-CO), 111.8 ppm (Isopr._{quart.}), 74.3 ppm (7-C), 71.9 ppm (6-C), 66.9 ppm (8-C), 61.9 ppm (8a/3-C), 61.8 ppm (8a/3-C), 53.1 ppm (CO₂CH₃), 31.7 ppm (2-C), 26.1 ppm (Isopr.-CH₃), 24.3 ppm (Isopr.-CH₃).

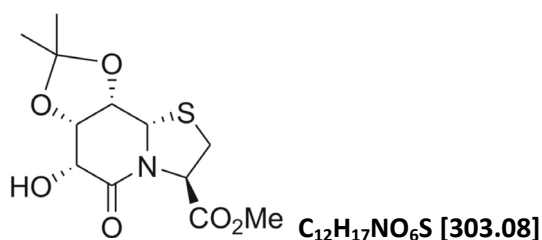
HRMS (ESI): für C₁₂H₁₇NO₆Na⁺ (M+Na⁺), ber.: 326.0669, gef.: 326.0672.

CHN-Analyse: ber.: C: 47.52% H: 5.65% N: 4.62%
gef.: C: 46.51% H: 5.57% N: 4.36%.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3581 w, 3531 w, 2990 w, 2942 w, 1761 s, 1750 s, 1664 s, 1417 s, 1375 m, 1321 w, 1262 s, 1176 m, 1109 w, 1089 w, 1057 w.

Drehwert: $[\alpha]_{\text{D}}^{18.5} = -89.8$, $[\alpha]_{578}^{18.5} = -94.0$, $[\alpha]_{546}^{18.5} = -107.4$, $[\alpha]_{436}^{18.5} = -189.1$, $[\alpha]_{365}^{18.5} = -303.6$
(c = 1.00 g/100 mL, MeOH).

8a(S)H-(7S,8S)-O-isopropyliden-(6R)-hydroxy-5oxo-hexahydro-thiazolo[3,2-a]pyridin-3(R)-carbonsäure-methylester (3)



5.00 g (16.5 mmol, 1.0 eq) der Verbindung **(2)** wurden in 50.0 mL Dichlormethan gelöst und 5.00 mL Trifluoressigsäure zugegeben. Es wurde für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt, anschließend zwei Mal gegen 100 mL Wasser ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. 4.73 g (15.6 mmol, 95%) der Verbindung **(3)** konnten als farbloses Pulvers erhalten werden.

Schmp.: 157 °C.

¹H-NMR: (600 MHz, DMSO_{d6}); δ = 5.25 ppm (d, $^3J_{6\text{-OH},6\text{-H}}$ = 6.3 Hz, 1 H, 6-OH), 5.21 ppm (dd, $^3J_{3\text{-H},2\text{-H}^{\text{proR}}}$ = 6.6 Hz, $^3J_{3\text{-H},2\text{-H}^{\text{proS}}}$ = 1.2 Hz, 1 H, 3-H), 4.95 ppm (d, $^3J_{8a\text{-H},8\text{-H}}$ = 2.1 Hz, 1 H, 8a-H), 4.57 ppm (dd, $^3J_{7\text{-H},8\text{-H}}$ = 7.6 Hz, $^3J_{7\text{-H},6\text{-H}}$ = 3.2 Hz, 1 H, 7-H), 4.42 ppm (dd, $^3J_{8\text{-H},7\text{-H}}$ = 7.6 Hz, $^3J_{8\text{-H},8a\text{-H}}$ = 2.1 Hz, 1 H, 8-H), 4.33 ppm (dd, $^3J_{6\text{-H},6\text{-OH}}$ = 6.2 Hz, $^3J_{6\text{-H},7\text{-H}}$ = 3.2 Hz, 1 H, 6-H), 3.67 ppm (s, 3 H, CO₂CH₃), 3.19 ppm (dd, $^2J_{2\text{-H}^{\text{proR}},2\text{-H}^{\text{proS}}}$ = 11.3 Hz, $^3J_{2\text{-H}^{\text{proR}},3\text{-H}}$ = 6.6 Hz, 1 H, 2-H^{proR}), 3.13 ppm (dd, $^2J_{2\text{-H}^{\text{proS}},2\text{-H}^{\text{proR}}}$ = 11.3 Hz, $^3J_{2\text{-H}^{\text{proS}},3\text{-H}}$ = 1.3 Hz, 1 H, 2-H^{proS}), 1.26 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃^t), 1.24 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃^h).

¹³C-NMR: (150 MHz, DMSO_{d6}); δ = 169.9 ppm (CO₂CH₃), 167.9 ppm (5-CO), 108.5 ppm (Isopr._{quart.}), 76.5 ppm (8-C), 76.0 ppm (7-C), 68.7 ppm (6-C), 61.2 ppm (3-C), 59.7 ppm (8a-C), 52.5 ppm (CO₂CH₃), 32.3 ppm (2-C), 26.2 ppm (Isopr.-CH₃), 24.1 ppm (Isopr.-CH₃).

HRMS (ESI): für C₁₂H₁₇NO₆SN⁺ (M+Na⁺), ber.: 326.0669, gef.: 326.0670.

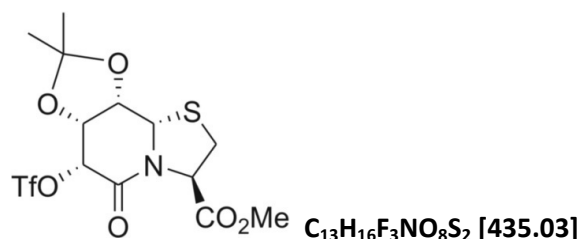
CHN-Analyse: ber.: C: 47.52% H: 5.65% N: 4.62%
gef.: C: 45.55% H: 6.25% N: 4.50%.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3409 s, 2952 m, 1746 s, 1661 s, 1458 m, 1383 m, 1213 m, 1131 m, 1083 m, 1011.5 w, 897 w.

Drehwert: $[\alpha]_{\text{D}}^{22.5} = -120.1$, $[\alpha]_{578}^{22.5} = -125.6$, $[\alpha]_{546}^{22.5} = -143.6$, $[\alpha]_{436}^{22.5} = -250.4$,

(c = 1.09 g/100 mL, CHCl₃).

8a(S)H-(7R,8S)-O-isopropyliden-5oxo-(6R)-trifluoromethansulfonyloxy-hexahydro-thiazolo[3,2-a]pyridin-3(R)-carbonsäure-methylester (4)



4.73 g (15.6 mmol, 1.0 eq) der Verbindung **(3)** wurden in 50.0 mL trockenem Dichlormethan gelöst, es wurden 2.00 mL trockenes Pyridin zugegeben und der Ansatz im Eisbad auf 0 °C herabgekühlt. Unter Rühren wurden 3.88 mL Trifluormethansulfonsäureanhydrid (23.4 mmol, 1.5 eq) in 5.00 mL trockenem Dichlormethan langsam zugegeben. Der Ansatz wurde für weitere 15 Minuten bei 0 °C und daraufhin für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 g Eis abgebrochen. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase noch zwei Mal mit je 50.0 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und eingeeengt. Nach dem Trocknen am Hochvakuum wurden 6.24 g (14.3 mmol, 92%) der Verbindung **(4)** als schwachbraunes Pulvers erhalten.

Schmp.: 201.5 °C.

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO_{d6}); δ = 6.02 ppm (d, $^3J_{6-H,7-H}$ = 3.4 Hz, 1 H, 6-H), 5.34-5.32 ppm (m, 1 H, 3-H), 5.22 ppm (d, $^3J_{8a-H,8-H}$ = 2.0 Hz, 1 H, 8a-H), 4.92 ppm (dd, $^3J_{7-H,8-H}$ = 7.6 Hz, $^3J_{7-H,6-H}$ = 3.6 Hz, 1 H, 7-H), 4.60 ppm (dd, $^3J_{8-H,7-H}$ = 7.6 Hz, $^3J_{8-H,8a-H}$ = 2.0 Hz, 1 H, 8-H), 3.70 ppm (s, 3 H, CO₂CH₃), 3.21 ppm (dd, $^2J_{2-H^{proR},2-H^{proS}}$ = 11.3 Hz, $^3J_{2-H^{proR},3-H}$ = 6.6 Hz, 1 H, 2-H^{proR}), 3.20 ppm (dd, $^2J_{2-H^{proS},2-H^{proR}}$ = 11.3 Hz, $^3J_{2-H^{proS},3-H}$ = 1.3 Hz, 1 H, 2-H^{proS}), 1.32 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃^t), 1.30 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃^h).

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO_{d6}); δ = 169.2 ppm (CO₂CH₃), 160.6 ppm (5-CO), 110.1 ppm (Isopr._{quart.}), 81.9 ppm (6 C), 76.7 ppm (8-C), 73.6 ppm (7-C), 61.7 ppm (3-C), 59.2 ppm (8a-C), 52.7 ppm (CO₂CH₃), 32.4 ppm (2-C), 25.9 ppm (Isopr.-CH₃), 24.0 ppm (Isopr.-CH₃).

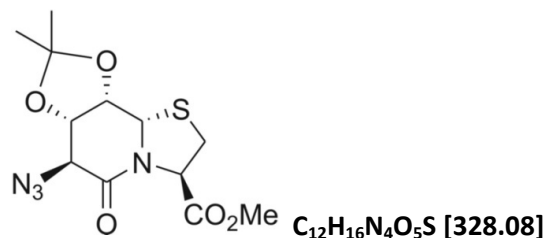
HRMS (ESI): für C₁₃H₁₆F₃NO₈S₂Na⁺ (M+Na⁺), ber.: 436.0342, gef.: 436.0339.

CHN-Analyse: ber.: C: 35.86% H: 3.70% N: 3.22%
gef.: C: 30.83% H: 5.75% N: 1.24%.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3435 m, 2964 m, 1749 s, 1699 s, 1420 s, 1372 w, 1260 m, 1215 s, 1144 m, 1092 m, 1007 m, 806 m.

Drehwert: $[\alpha]_D^{22.0} = -77.7$, $[\alpha]_{578}^{22.0} = -81.2$, $[\alpha]_{546}^{22.0} = -92.5$ (c = 1.10 g/100 mL, CHCl₃).

8a(S)H-(6S)-azido-(7S,8S)-O-isopropyliden-5oxo-hexahydro-thiazolo[3,2-a]pyridine-3(R)-carbonsäure-methylester (5)



6.24 g (14.3 mmol, 1.0 eq) der Verbindung **(4)** wurden in 20.0 mL DMF gelöst, es wurden 4.65 g (71.5 mmol, 5.0 eq) Natriumazid zugegeben und bei Raumtemperatur für 36 Stunden gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Zu dem Rückstand wurden 100 mL Wasser gegeben und drei Mal mit je 50.0 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel weitestgehend entfernt. Aus dem Rückstand kristallisierten innerhalb von zwei Tagen 4.46 g (13.6 mmol, 95%) des Azids **(5)** als farblose Kristalle.

Schmp.: 105.5 °C.

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃); δ = 5.39 ppm (dd, $^3J_{3-H,2-H^{proR}}$ = 5.7 Hz, $^3J_{3-H,2-H^{proS}}$ = 1.6 Hz, 1 H, 3-H), 5.19 ppm (d, $^3J_{8a-H,8-H}$ = 2.0 Hz, 1 H, 8a-H), 4.49 ppm (dd, $^3J_{8-H,7-H}$ = 7.2 Hz, $^3J_{8-H,8a-H}$ = 2.0 Hz, 1 H, 8-H), 4.40 ppm (dd, $^3J_{7-H,8-H}$ = 7.2 Hz, $^3J_{7-H,6-H}$ = 2.3 Hz, 1 H, 7-H), 4.30 ppm (d, $^3J_{6-H,7-H}$ = 2.3 Hz, 1 H, 6-H), 3.79 ppm (s, 3 H, CO₂CH₃), 3.26 ppm (dd, $^2J_{2-H^{proS},2-H^{proR}}$ = 11.1 Hz, $^3J_{2-H^{proS},3-H}$ = 1.1 Hz, 1 H, 2-H^{proS}), 3.22 ppm (dd, $^2J_{2-H^{proR},2-H^{proS}}$ = 11.1 Hz, $^3J_{2-H^{proR},3-H}$ = 5.7 Hz, 1 H, 2-H^{proR}), 1.37 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃^t), 1.35 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃^h).

^{13}C -NMR: (125 MHz, CDCl_3); δ = 169.4 ppm (CO_2CH_3), 164.0 ppm (5-CO), 110.3 ppm (Isopr._{quart.}), 76.1 ppm (8-C), 75.0 ppm (7-C), 62.2 ppm (6-C), 61.8 ppm (3-C), 59.9 ppm (8a-C), 53.3 ppm (CO_2CH_3), 31.8 ppm (2-C), 26.4 ppm (Isopr.- CH_3), 24.2 ppm (Isopr.- CH_3).

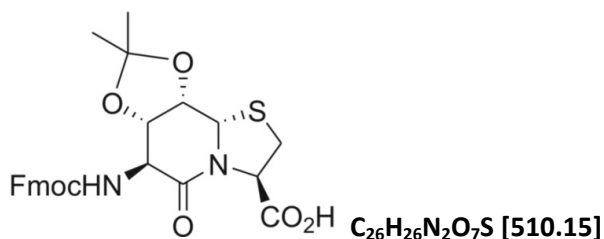
HRMS (ESI): für $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_5\text{SNa}^+$ ($\text{M}+\text{Na}^+$), ber.: 329.0914, gef.: 329.0911.

CHN-Analyse: ber.: C: 43.90% H: 4.91% N: 17.06%
gef.: C: 43.19% H: 5.59% N: 16.02%.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3437 s, 2996 w, 2964 w, 2924 w, 2116 s, 1729 s, 1682 s, 1422 m, 1379 m, 1317 w, 1286 m, 1262 m, 1243 m, 1213 m, 1061 m.

Drehwert: $[\alpha]_{\text{D}}^{22.0} = -256.9$, $[\alpha]_{578}^{22.0} = -268.5$, $[\alpha]_{546}^{22.0} = -306.4$, ($c = 1.10 \text{ g}/100 \text{ mL}$, CHCl_3).

8a(S)H-6(S)-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-(7S,8S)-O-isopropyliden-5oxo-hexahydro-thiazolo[3,2-a]pyridin-3(R)-carbonsäure (6)



16.1 g (49.1 mmol, 1.0 eq) der Verbindung (**5**) wurden in 80 ml DCM/MeOH 1:1 gelöst. Es wurden 1.60 g Palladium auf Aktivkohle zugegeben und der Ansatz für drei Tage unter eine Wasserstoffatmosphäre von 10 bar im Autoklaven gerührt. Zum Abtrennen des Katalysators wurde über Kieselgur filtriert, das Filtrat eingengt und am Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde in etwa 200 ml 1,4-Dioxan mit wenig Wasser gelöst, es erfolgte die Zugabe von 50 mL LiOH ($c = 1 \text{ mol/L}$). Nach etwa 15 Minuten wurde der Ansatz mit HCl ($c = 1 \text{ mol/L}$) neutralisiert, das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand am Hochvakuum getrocknet.

Das verseifte Dipeptid wurde in 200 mL 1,4-Dioxan/Wasser 4:1 gelöst und auf 0 °C herabgekühlt, anschließend wurden langsam 21.5 g (63.8 mmol, 1.3 eq) Fmoc-OSu in 50 mL 1,4-Dioxan zugegeben. Der pH-Wert wurde mittels DIPEA auf etwa neun eingestellt. Es wurde für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt, eine anschließende DC-Kontrolle (DCM/MeOH 5:1; $R_f = 0.43$) zeigte den vollständigen Umsatz der Reaktion an, daraufhin wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in etwa 200 mL Essigsäureethylester und 50 ml Wasser aufgenommen, die wässrige Phase wurde mit HCl ($c = 1 \text{ mol/L}$) auf pH = 2 eingestellt und abgetrennt. Anschließend wurde noch drei Mal mit Essigsäureethylester extrahiert, die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurden 21.2 g (42.0 mmol, 86%) des Produkts als farbloser Feststoff erhalten.

Schmp.: zers. > 270 °C.

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO_{d6}); δ = 7.88 ppm (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.6$ Hz, 2 H, Fmoc_{arom.}), 7.72 ppm (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.1$ Hz, 2 H, Fmoc_{arom.}), 7.42 ppm (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 2 H, Fmoc_{arom.}), 7.34 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.6$ Hz, 2 H, Fmoc_{arom.}), 5.28 ppm (s, 1 H, 8a-H), 4.84 ppm (d, $^3J_{3\text{-H},2\text{-H}^{\text{proR}}} = 6.2$ Hz, 1 H, 3-H), 4.47 ppm (dd, $^3J_{8\text{-H},7\text{-H}} = 7.2$ Hz, $^3J_{8\text{-H},8\text{a-H}} = 2.2$ Hz, 1 H, 8-H), 4.41 ppm (dd, $^3J_{7\text{-H},8\text{-H}} = 7.2$ Hz, $^3J_{7\text{-H},6\text{-H}} = 1.8$ Hz, 1 H, 7-H), 4.38 - 4.30 ppm (m, 2 H, Fmoc-CH₂), 4.24 - 4.23 ppm (m, 1 H, 6-H), 4.12 ppm (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.6$ Hz, 1 H, Fmoc-CH), 3.19 ppm (d, $^2J_{2\text{-H}^{\text{proS}},2\text{-H}^{\text{proR}}} = 10.2$ Hz, 1 H, 2-H^{proS}), 2.99 ppm ($^2J_{2\text{-H}^{\text{proR}},2\text{-H}^{\text{proS}}} = 10.3$ Hz, $^3J_{2\text{-H}^{\text{proR}},3\text{-H}} = 6.2$ Hz, 1 H, 2-H^{proR}), 1.27 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃^t), 1.26 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃^h).

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO_{d6}); δ = 172.8 ppm (C=O₂H), 164.3 ppm (5-CO), 156.0 ppm (Fmoc-CO), 143.8 ppm (Fmoc_{quart.}), 140.7 ppm (Fmoc_{quart.}), 127.6 ppm (C-Fmoc_{arom.}), 127.1 ppm (C-Fmoc_{arom.}), 125.2 ppm (C-Fmoc_{arom.}), 120.1 ppm (C-Fmoc_{arom.}), 108.2 ppm (Isopr._{quart.}), 75.6 ppm (7-C), 75.2 ppm (8-C), 66.1 ppm (Fmoc-CH₂), 63.7 ppm (3-C), 59.0 ppm (8a-C), 55.0 ppm (Fmoc-CH), 46.6 ppm (6-C), 31.7 ppm (2-C), 26.3 ppm (Isopr.-CH₃), 24.1 ppm (Isopr.-CH₃).

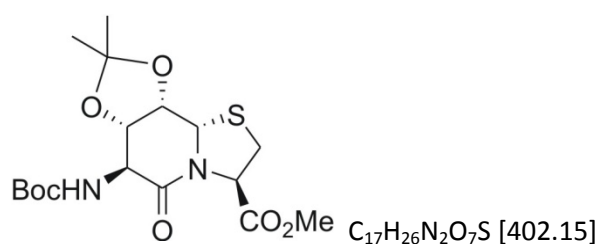
HRMS (ESI): für C₂₆H₂₆N₂O₇SN⁺ (M+Na⁺), ber.: 533.1353, gef.: 533.1371.

CHN-Analyse: ber.: C: 61.16% H: 5.13% N: 5.49%
gef.: C: 53.45% H: 5.51% N: 4.72%.

IR (KBr): $\hat{\nu}$ = 3414 br, 2986 m, 1723 s, 1654 s, 1450 m, 1406 m, 1265 m, 1213 m, 1163 s, 1120 s, 1066 m, 888 m, 872 m, 760 m, 741 m.

Drehwert: $[\alpha]_{\text{D}}^{21.5} = -61.3$, $[\alpha]_{578}^{21.5} = -66.0$, $[\alpha]_{546}^{21.5} = -75.9$, $[\alpha]_{436}^{21.5} = -131.7$, $[\alpha]_{365}^{21.5} = -229.5$,
(c = 0.98 g/100 mL, MeOH).

8a(S)H-6(S)-tert-butyloxycarbonylamino-(7S,8S)-O-isopropyliden-5oxo-hexahydro-thiazolo[3,2-a]pyridin-3(R)-carbonsäure-methylester (7)



500 mg (1.66 mmol, 1.0 eq) der Verbindung **(53)** wurden in 20.0 mL DCM gelöst, anschließend wurden 290 μ L (1.66 mmol, 1.0 eq) DIPEA und 545 mg (2.49 mmol, 1.5 eq) Boc₂O zugegeben und der Ansatz für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand flashchromatographisch aufgereinigt (EE/DCM 2:1; R_f = 0.53). Es wurden 425 mg (1.06 mmol, 64%) der Verbindung **(7)** in Form eines farblosen Pulvers erhalten.

Schmp.: 95.5 °C.

¹H-NMR: (600 MHz, CDCl₃); δ = 5.41 ppm (dd, $^3J_{3-H,2-H^{proR}}$ = 6.1 Hz, $^3J_{3-H,2-H^{proS}}$ = 1.5 Hz, 1 H, 3-H), 5.12 ppm (d, $^3J_{8a-H,8-H}$ = 2.0 Hz, 1 H, 8a-H), 4.79 ppm (s br, 2 H, 7-H, NH-Boc), 4.42 ppm (dd, $^3J_{8-H,7-H}$ = 7.2 Hz, $^3J_{8-H,8a-H}$ = 2.1 Hz, 1 H, 8-H), 4.30 ppm (dd, $^3J_{6-H,6-NH}$ = 4.4 Hz, $^3J_{6-H,7-H}$ = 2.2 Hz, 1 H, 6-H), 3.78 ppm (s, 3 H, CO₂CH₃), 3.25 ppm (dd, $^2J_{2-H^{proR},2-H^{proS}}$ = 11.2 Hz, $^3J_{2-H^{proR},3-H}$ = 6.1 Hz, 1 H, 2-H^{proR}), 3.20 ppm (dd, $^2J_{2-H^{proS},2-H^{proR}}$ = 11.2 Hz, $^3J_{2-H^{proS},3-H}$ = 1.5 Hz, 1 H, 2-H^{proS}), 1.45 ppm (s, 9 H, Boc-(CH₃)₃), 1.37 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃^t), 1.35 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃^h).

¹³C-NMR: (150 MHz, CDCl₃); δ = 169.8 ppm (C=O₂CH₃), 165.6 ppm (CO), 155.4 ppm (CO-Boc), 109.8 ppm (Isopr.-quart.), 75.7 ppm (8-C), 75.1 ppm (7-C), 61.7 ppm (3-C), 60.5 ppm (8a-C), 56.0 ppm (6-C), 53.2 ppm (CO₂CH₃), 31.6 ppm (2-C), 28.4 ppm (Boc-(CH₃)₃), 26.5 ppm (Isopr.-CH₃), 24.3 ppm (Isopr.-CH₃).

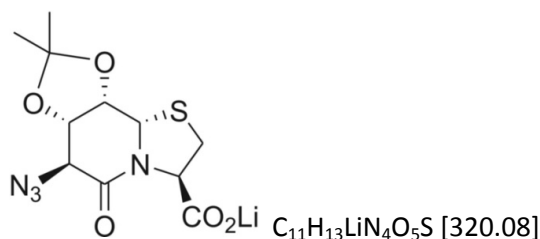
HRMS (ESI): für C₁₇H₂₆N₂O₇SN⁺ (M+Na⁺), ber.: 425.1353, gef.: 425.1363.

CHN-Analyse: ber.: C: 50.73 % H: 6.51 % N: 6.96 %
gef.: C: 53.42 % H: 7.61 % N: 6.66 %.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3287 s, 2991 m, 1760 s, 1718 s, 1662 s, 1533 s, 1419 m, 1368 m, 1303.9 m, 1252 m, 1214 s, 1166 s, 1065 m, 1045 m, 1020 m.

Drehwert: $[\alpha]_D^{21.5} = -94.5$, $[\alpha]_{578}^{21.5} = -98.9$, $[\alpha]_{546}^{21.5} = -113.5$, $[\alpha]_{436}^{21.5} = -204.2$, $[\alpha]_{365}^{21.5} = -326.5$,
(c = 1.11 g/100 mL, CHCl₃).

8a(S)H-(6S)-azido-(7S,8S)-O-isopropyliden-5oxo-hexahydro-thiazolo[3,2-a]pyridin-3(R)-lithiumcarboxylat (8)



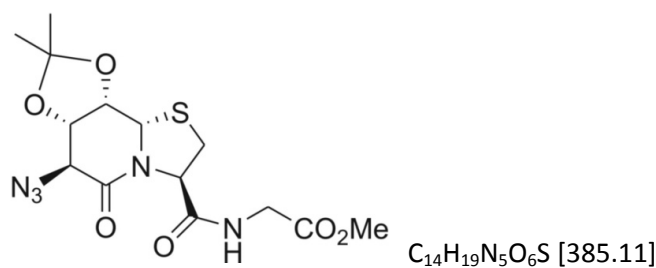
1.00 g (3.05 mmol, 1.0 eq) der Verbindung **(5)** wurde in 10.0 mL Methanol gelöst, anschließend wurden 6.00 mL (6.00 mmol, 2.0 eq) 1N LiOH zugegeben und bei Raumtemperatur gerührt. Mittels DC-Kontrolle (DCM/EE 2:1) wurde der Reaktionsfortschritt kontrolliert. Nach vollständiger Hydrolyse des Esters wurde mit 1N HCl neutralisiert, das Lösungsmittel entfernt und der Ansatz am Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde in wenig Methanol aufgenommen und in Diethylether gefällt, zuletzt wurde der Niederschlag durch Vakuumfiltration isoliert und am Hochvakuum getrocknet. Es wurde 1.12 g (keine Berechnung der Ausbeute, da LiCl zusätzlich vorhanden war) eines farblosen Feststoffs erhalten.

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO_{d6}); δ = 4.98 ppm (d, $^3J_{8a-H,8-H}$ = 2.0 Hz, 1 H, 8a-H), 4.71 ppm (d, $^3J_{3-H,2-H^{proR}}$ = 6.1 Hz), 4.47 ppm (dd, $^3J_{8-H,7-H}$ = 7.1 Hz, $^3J_{8-H,8a-H}$ = 2.2 Hz, 1 H, 8-H), 4.40 ppm (dd, $^3J_{7-H,8-H}$ = 7.1 Hz, $^3J_{7-H,6-H}$ = 2.2 Hz, 1 H, 7-H), 4.27 ppm (d, $^3J_{6-H,7-H}$ = 2.2 Hz, 1 H, 7-H), 3.15 ppm (dd, $^2J_{2-H^{proS},2-H^{proR}}$ = 10.2 Hz, $^3J_{2-H^{proS},3-H}$ = 0.8 Hz, 1 H, 2-H^{proS}), 2.87 ppm (dd, $^2J_{2-H^{proR},2-H^{proS}}$ = 10.2 Hz, $^3J_{2-H^{proR},3-H}$ = 6.4 Hz, 1 H, 2-H^{proR}), 1.27 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃^t), 1.24 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃^h).

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO_{d6}); δ = 169.8 ppm (CO₂H), 162.3 ppm (5-CO), 108.5 ppm (Isopr.-quart.), 75.2 ppm (8-C), 74.1 ppm (7-C), 64.1 ppm (3-C), 61.6 ppm (6-C), 59.2 ppm (8a-C), 32.2 ppm (2-C), 26.2 ppm (Isopr.-CH₃), 24.2 ppm (Isopr.-CH₃).

IR (KBr): $\hat{\nu}$ = 3421 s, 2988 w, 2123 s, 1631 s, 1446 m, 1409 m, 1384 m, 1270 w, 1211 m, 1161 w, 1071 m, 617 w, 582 w, 517 w, 440 w.

(6S)-azido-Pli^P=Cat-Gly-OMe (9)



500 mg (1.5 mmol, 1.0 eq) der Verbindung (**5**) wurden in 5.00 mL Methanol gelöst, es erfolgte die Zugabe von 3 mL (3.0 mmol, 2.0 eq) 1N LiOH. Durch DC-Kontrolle (DCM/EE 2:1) wurde der Reaktionsfortschritt verfolgt. Nach vollständiger Hydrolyse des Esters wurde mit 1N HCl neutralisiert, das Lösungsmittel entfernt und der Ansatz am Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde in 10.0 mL DMF aufgenommen, es wurden 640 mg (1.6 mmol, 1.1 eq) HBTU, 235 mg (1.5 mmol, 1.0 eq) HOBT und 220 mg (1.8 mmol, 1.2 eq) Glycinmethylester-HCl zugegeben. Der pH-Wert wurde durch DIPEA-Zugabe auf pH = 8 eingestellt und der Ansatz für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand mit 100 mL DCM aufgenommen und gegen jeweils 50.0 mL Salzsäure (c = 0.5 mol/L), gesättigte NaHCO₃-Lösung sowie gesättigte NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde abschließend säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/EE 2:1; R_f = 0.46). Es wurden 320 mg (0.83 mmol, 83%) der Verbindung (**9**) in Form eines farblosen Pulvers erhalten.

Schmp.: 158.0°C.

¹H-NMR: (600 MHz, DMSO_{d6}); δ = 8.31 ppm (t, $^3J_{Gly-NH,Gly-CH_2}$ = 5.9 Hz, 1 H, Gly-NH), 5.13 ppm (d, $^3J_{8a-H,8-H}$ = 2.0 Hz, 1 H, 8a-H), 5.10 ppm (dd, $^3J_{3-H,2-H^{proR}}$ = 6.6 Hz, $^3J_{3-H,2-H^{proS}}$ = 1.4 Hz, 1 H, 3-H), 4.55 ppm (dd, $^3J_{8-H,7-H}$ = 7.1 Hz, $^3J_{8-H,8a-H}$ = 2.0 Hz, 1 H, 8-H), 4.50 ppm (dd, $^3J_{7-H,8-H}$ = 7.1 Hz, $^3J_{7-H,6-H}$ = 2.3 Hz, 1 H,

7-H), 4.43 ppm (d, $^3J_{6-H,7-H} = 2.3$ Hz, 1 H, 6-H), 3.92 ppm (dd, $^2J_{\alpha^t-H,\alpha^h-H} = 17.4$ Hz, $^3J_{\alpha^t-H,N-H} = 6.0$ Hz, 1 H, α^t-H), 3.87 ppm (dd, $^2J_{\alpha^h-H,\alpha^t-H} = 17.4$ Hz, $^3J_{\alpha^h-H,N-H} = 5.8$ Hz, 1 H, α^h-H), 3.64 ppm (s, 3 H, CO_2CH_3), 3.13 ppm (dd, $^2J_{2-H^{\text{proR}},2-H^{\text{proS}}} = 11.3$ Hz, $^3J_{2-H^{\text{proR}},3-H} = 6.7$ Hz, 1 H, 2-H^{proR}), 3.05 ppm (dd, $^2J_{2-H^{\text{proS}},2-H^{\text{proR}}} = 11.3$ Hz, $^3J_{2-H^{\text{proS}},3-H} = 1.5$ Hz, 1 H, 2-H^{proS}), 1.29 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃^t), 1.26 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃^h).

¹³C-NMR: (150 MHz, DMSO_{d6}); $\delta = 170.0$ ppm (CO_2CH_3), 169.0 ppm (3-CO), 163.9 ppm (5-CO), 108.8 ppm (Isopr.-quart.), 75.4 ppm (8-C), 74.3 ppm (7-C), 62.2 ppm (3-C), 61.1 ppm (6-C), 60.4 ppm (8a-C), 51.7 ppm (CO_2CH_3), 40.8 ppm (α -C), 32.1 ppm (2-C), 26.1 ppm (Isopr.-CH₃), 24.0 ppm (Isopr.-CH₃).

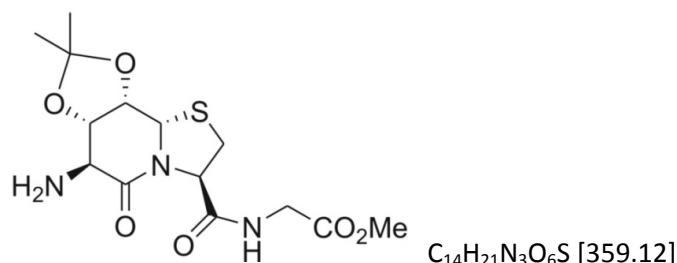
HRMS (ESI): für C₁₄H₁₉N₅O₆S Na⁺ (M+Na⁺), ber.: 408.0948, gef.: 408.0947.

CHN-Analyse: ber.: C: 43.63% H: 4.97% N: 18.17%
gef.: C: 43.56% H: 5.11% N: 17.58%.

IR (KBr): $\hat{\nu} = 3344$ br, 2990 m, 2939 m, 2113 s, 1752 s, 1677 s, 1530 m, 1416 m, 1376 m, 1211 s, 1066 m, 982 w, 885 m, 616 w, 549 w.

Drehwert: $[\alpha]_{\text{D}}^{19.0} = -221.4$, $[\alpha]_{578}^{19.0} = -232.0$, $[\alpha]_{546}^{19.0} = -266.6$, $[\alpha]_{436}^{19.0} = -484.3$, $[\alpha]_{365}^{19.0} = -817.2$,
(c = 1.075 g/100 mL, MeOH).

(6S)-amino-Pli^P=Cat-Gly-OMe (10)



500 mg (13.6 mmol) der Verbindung (9) wurden in 10.0 mL Methanol gelöst und mit 80.0 mg Palladium auf Aktivkohle (10%ig) versetzt. Der Ansatz wurde für drei Stunden unter einer Wasserstoffatmosphäre von 1 bar gerührt. Zum Abtrennen des Katalysators wurde über Kieselgur filtriert, das Filtrat eingeeengt und am Hochvakuum getrocknet. Es wurden 453 mg (1.26 mmol, 97%) der Verbindung (10) als farbloser, kristalliner Feststoff erhalten

Schmp.: 186.0 °C.

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO_{d6}); $\delta = 7.95$ ppm (t, $^3J_{\text{Gly-NH,Gly-CH}_2} = 5.9$ Hz, 1 H, Gly-NH), 5.48 ppm (d, $^3J_{8a-H,8-H} = 2.1$ Hz, 1 H, 8a-H), 5.06 ppm (dd, $^3J_{3-H,2-H^{\text{proR}}} = 6.1$ Hz, $^3J_{3-H,2-H^{\text{proS}}} = 1.6$ Hz, 1 H, 3-H), 4.50 ppm (dd, $^3J_{8-H,7-H} = 7.2$ Hz, $^3J_{8-H,8a-H} = 2.1$ Hz, 1 H, 8-H), 4.31 ppm (dd, $^3J_{7-H,8-H} = 7.2$ Hz, $^3J_{7-H,6-H} = 2.2$ Hz, 1 H, 7-H), 3.85 ppm (d, $^3J_{\alpha-H,NH} = 5.9$ Hz, 2 H, α -CH₂), 3.63 ppm (s, 3 H, CO_2CH_3), 3.49 ppm (d,

$^3J_{6-H,7-H} = 2.2$ Hz, 1 H, 6-H), 3.09 ppm (dd, $^2J_{2-H^{proS},2-H^{proR}} = 11.0$ Hz, $^3J_{2-H^{proS},3-H} = 1.6$ Hz, 1 H, 2-H^{proS}), 3.06 ppm (dd, $^2J_{2-H^{proR},2-H^{proS}} = 11.0$ Hz, $^3J_{2-H^{proR},3-H} = 6.1$ Hz, 1 H, 2-H^{proR}), 1.26 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃^t), 1.24 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃^h).

^{13}C -NMR: (125 MHz, DMSO-d₆); $\delta = 169.9 - 169.5$ ppm (CO₂CH₃/ 3-CO/ 5-CO), 108.0 ppm (Isopr.-quart.), 77.1 ppm (7-C), 76.5 ppm (8-C), 62.6 ppm (3-C), 60.1 ppm (8a-C), 56.2 ppm (6-C), 51.7 ppm (CO₂-CH₃), 40.9 ppm (α -C), 31.1 ppm (2-C), 26.3 ppm (Isopr.-CH₃), 23.9 ppm (Isopr.-CH₃).

HRMS (ESI): für C₁₄H₂₁N₃O₆S Na⁺ (M+Na⁺), ber.: 382.1043, gef.: 382.1040.

CHN-Analyse: ber.: C: 46.79% H: 5.89% N: 11.69%

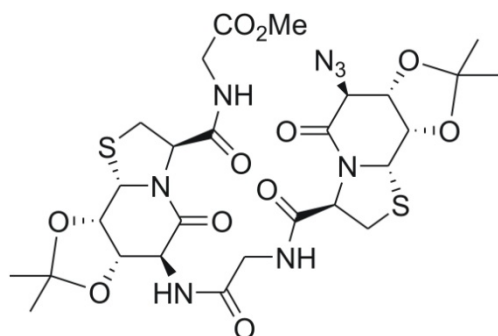
gef.: C: 46.60% H: 5.81% N: 11.39%.

IR (KBr): $\hat{\nu} = 3423$ m, 3376 m, 2982 m, 2950 m, 2898 m, 1754 s, 1667 s, 1524 s, 1407 m, 1376 m, 1257 w, 1212 m, 1172 w, 1071 w, 1051 w.

Drehwert: $[\alpha]_D^{19.0} = -149.2$, $[\alpha]_{578}^{19.0} = -156.3$, $[\alpha]_{546}^{19.0} = -179.4$, $[\alpha]_{436}^{19.0} = -321.8$, $[\alpha]_{365}^{19.0} = -512.8$,

(c = 1.047 g/100 mL, MeOH).

(6S)-azido-Pli^P=Cat-Gly-Pli^P=Cat-Gly-OMe (11)



C₂₇H₃₆N₈O₁₁S₂ [712.19]

460 mg (1.19 mmol, 1.1 eq) der Verbindung **(9)** wurden in 5.00 mL Methanol gelöst, anschließend wurden 2.00 mL (2.00 mmol, 1.7 eq) 1N LiOH zugegeben und bei Raumtemperatur gerührt. Mittels DC-Kontrolle (DCM/EE 2:1) wurde der Reaktionsfortschritt kontrolliert. Nach vollständiger Hydrolyse des Esters wurde mit 1N HCl neutralisiert, das Lösungsmittel entfernt und der Ansatz am Hochvakuum getrocknet.

Der Rückstand wurde in 10.0 mL DMF aufgenommen, es folgte die Zugabe von 405 mg (1.13 mmol, 1.0 eq) der Verbindung **(10)**, 184 mg (1.20 mmol, 1.1 eq) HOBt und 455 mg (1.20 mmol, 1.1 eq) HBTU. Der pH-Wert der Lösung wurde mit DIPEA auf pH = 8 eingestellt und der Ansatz bei Raumtemperatur für 16 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand mit 100 ml DCM aufgenommen und gegen jeweils 50.0 mL Salzsäure (c = 0.5 mol/L), gesättigte NaHCO₃-Lösung sowie gesättigte NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Das Produkt wurde flashchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 25:1; DC-Kontrolle in DCM/MeOH 10:1 R_f = 0.54), dabei wurden 389 mg (0.55 mmol, 49%) der Verbindung **(11)** als farbloser Feststoff erhalten.

Schmp.: 133.0 °C.

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆); δ = 8.31 ppm (d, ³J_{6'-NH,6'-H} = 6.3 Hz, 1 H, 6'-NH), 8.21 ppm (t, ³J_{Gly-NH,α-H} = 5.5 Hz, 1 H, Gly-NH), 8.17 ppm (t, ³J_{Gly'-NH,α-H} = 5.9 Hz, 1 H, Gly'-NH), 5.25 ppm (d, ³J_{8a'-H,8'-H} = 1.9 Hz, 1 H, 8a'-H), 5.14 ppm (d, ³J_{8a-H,8-H} = 2.0 Hz, 1 H, 8a-H), 5.08 ppm (dd, ³J_{3-H,2-H}^{proR} = 6.2 Hz, ³J_{3-H,2-H}^{proS} = 2.2 Hz, 1 H, 3-H), 5.03 ppm (dd, ³J_{3'-H,2'-H}^{proR} = 6.8 Hz, ³J_{3'-H,2'-H}^{proS} = 1.2 Hz, 1 H, 3'-H), 4.56 ppm (dd, ³J_{8-H,7-H} = 7.1 Hz, ³J_{8-H,8a-H} = 2.0 Hz, 1 H, 8-H), 4.53 ppm (dd, ³J_{8'-H,7'-H} = 7.0 Hz, ³J_{8'-H,8a'-H} = 1.9 Hz, 1 H, 8'-H), 4.51 ppm (dd, ³J_{7-H,8-H} = 7.1 Hz, ³J_{7-H,6-H} = 2.3 Hz, 1 H, 7-H), 4.46 ppm (dd, ³J_{7'-H,8'-H} = 7.1 Hz, ³J_{7'-H,6'-H} = 1.9 Hz, 1 H, 7'-H), 4.44 ppm (d, ³J_{6-H,7-H} = 2.3 Hz, 1 H, 6-H), 4.26 ppm (dd, ³J_{6'-H,6'-NH} = 6.2 Hz, ³J_{6'-H,7'-H} = 2.0 Hz, 1 H, 6'-H), 3.90 ppm (dd, ²J_{α-H,α-H} = 16.7 Hz, ³J_{α-H,Gly-NH} = 6.0 Hz, 1 H, α^T-H), 3.87 ppm (d, ³J_{α'-H,Gly-NH} = 5.9 Hz, 2 H, α'-H), 3.77 ppm (dd, ²J_{α-H,α-H} = 16.6 Hz, ³J_{α-H,Gly-NH} = 5.0 Hz, 1 H, α^H-H), 3.63 ppm (s, 3 H, OMe), 3.17 ppm (dd, ²J_{2'-H}^{proR}_{,2'-H}^{proS} = 11.1 Hz, ³J_{2'-H}^{proR}_{,3'-H} = 6.8 Hz, 1 H, 2'-H^{proR}), 3.14 ppm (dd, ²J_{2-H}^{proR}_{,2-H}^{proS} = 11.3 Hz, ³J_{2-H}^{proR}_{,3-H} = 6.2 Hz, 1 H, 2-H^{proR}), 3.11 ppm (dd, ²J_{2-H}^{proS}_{,2-H}^{proR} = 11.3 Hz, ³J_{2-H}^{proS}_{,3-H} = 2.3 Hz, 1 H, 2-H^{proS}), 3.08 ppm (dd, ²J_{2'-H}^{proS}_{,2'-H}^{proR} = 11.1 Hz, ³J_{2'-H}^{proS}_{,3'-H} = 1.2 Hz, 1 H, 2'-H^{proS}), 1.29 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃), 1.28 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃), 1.27 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃), 1.26 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃).

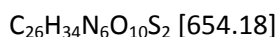
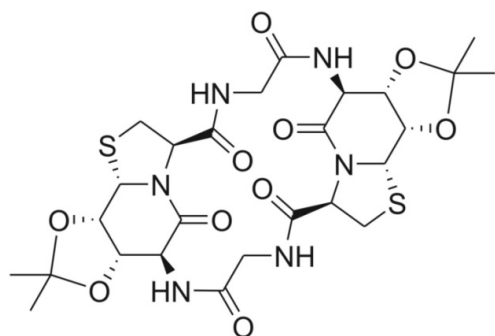
¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO-d₆); δ = 169.8 ppm (Gly'-CO₂Me), 169.5 ppm (3'-CO), 169.0 ppm (Gly-CO), 168.8 ppm (3-CO), 165.4 ppm (5'-CO), 164.0 ppm (5-CO), 108.9 ppm (Isopr.-quart.), 108.5 ppm (Isopr.-quart.), 76.3 ppm (8'-C), 75.2 ppm (8-C), 75.1 ppm (7'-C), 74.3 ppm (7-C), 63.3 ppm (3'-C), 62.3 ppm (3-C), 61.1 ppm (6-C), 60.6 ppm (8a-C), 60.5 ppm (8a'-C), 54.0 ppm (6'-C), 51.7 ppm (OCH₃), 42.2 ppm (α-C), 41.0 ppm (α'-C), 32.1 ppm (2-C), 31.5 ppm (2'-C), 26.2 ppm (Isopr.-CH₃), 26.1 ppm (Isopr.-CH₃), 24.0 ppm (Isopr.-CH₃), 23.9 ppm (Isopr.-CH₃).

HRMS (ESI): für C₂₇H₃₆N₈O₁₁S₂Na⁺ (M+Na⁺), ber.: 735.1827, gef.: 735.1963.

CHN-Analyse: ber.: C: 45.50% H: 5.09% N: 15.72%.
gef.: C: 44.06% H: 5.46% N: 14.96%.

IR (KBr): $\hat{\nu}$ = 3340 w, 2988 m, 2938 m, 2113 m, 1755 m, 1679 s, 1535 m, 1413 m, 1377 m, 1212 s, 1163 m, 1066 m, 886 w.

Drehwert: $[\alpha]_{\text{D}}^{19.0} = -142.5$, $[\alpha]_{578}^{19.0} = -149.5$, $[\alpha]_{546}^{19.0} = -172.1$, $[\alpha]_{436}^{19.0} = -315.4$, $[\alpha]_{365}^{19.0} = -534.7$,
(c = 1.036 g/100 mL, MeOH).

zyklo-[Pli^P=Cat-Gly]₂ (12)

550 mg (0.77 mmol) der Verbindung **(11)** wurden in 5.00 mL Methanol gelöst und mit 60.0 mg Palladium auf Aktivkohle (10%ig) versetzt. Der Ansatz wurde für 24 Stunden unter einer Wasserstoffatmosphäre von 10 bar im Autoklaven gerührt. Zum Abtrennen des Katalysators wurde über Kieselgur filtriert, das Filtrat eingeeengt und am Hochvakuum getrocknet. Das erhaltene Amin wurde in 5.00 mL Methanol gelöst, anschließend wurden 1.60 mL (1.60 mmol, 2.1 eq) 1N LiOH zugegeben und bei Raumtemperatur gerührt. Mittels DC-Kontrolle (DCM/MeOH 10:1) wurde der Reaktionsfortschritt kontrolliert. Nach vollständiger Hydrolyse des Esters wurde mit 1N HCl neutralisiert, das Lösungsmittel durch Koevaprieren mit EtOH entfernt und der Ansatz am Hochvakuum getrocknet.

Das offenkettige Hexapeptid wurde in 600 mL DMF gelöst und auf 0 °C herabgekühlt, es wurden aufgrund eines Rechenfehlers jeweils nur ein, anstelle von drei Äquivalenten NaHCO₃ und DPPA zugegeben, im folgenden waren dies 65 mg (0.77 mmol, 1.0 eq) NaHCO₃ und 167 µL (0.77 mmol, 1.0 eq) DPPA. Der Ansatz wurde für vier Tage bei 0 °C und einen Tag bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 mL Wasser abgebrochen, anschließend wurde der Ansatz filtriert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in wenig MeOH/DCM 1:1 aufgenommen und in Diethylether gefällt, dieser Schritt wurde zwei Mal wiederholt. Daraufhin wurde der am Hochvakuum getrocknete Rückstand in 50 mL Wasser suspendiert und im Ultraschallbad behandelt. Der zurückbleibende Niederschlag wurde abzentrifugiert und erneut mit Wasser und darauf mit Methanol gewaschen; das Produkt wurde zuletzt am Hochvakuum getrocknet. Es konnten 250 mg (0.38 mmol, 49%) des zyklischen Hexapeptids **(12)** als farbloser, phosphatfreier Feststoff erhalten werden.

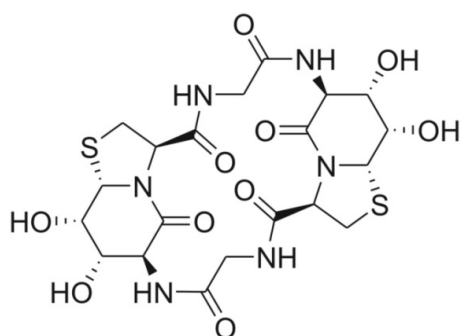
¹H-NMR: (600 MHz, DMSO-d₆); δ = 8.68 ppm (d, ³J_{6-NH,6-H} = 3.4 Hz, 1 H, 6-NH), 7.52 ppm (t, ³J_{Gly-NH,α-H} = 4.2 Hz, 1 H, Gly-NH), 5.15 ppm (d, ³J_{3-H,2-H}^{proR} = 6.3 Hz, 1 H, 3-H), 5.12 ppm (d, ³J_{8a-H,8-H} = 1.7 Hz, 1 H, 8a-H), 4.52 ppm (dd, ³J_{7-H,8-H} = 6.8 Hz, ³J_{7-H,6-H} = 2.0 Hz, 1 H, 7-H), 4.49 ppm (dd, ³J_{8-H,7-H} = 6.8 Hz, ³J_{8-H,8a-H} = 1.7 Hz, 1 H, 8-H), 3.93-3.87 ppm (m, 2 H, 6 H/α^T-H), 3.82 ppm (dd, ²J_{α-H,α-H} = 16.7 Hz, ³J_{α-H,Gly-NH} = 3.8 Hz, 1 H, α^H-H), 3.23 ppm (d, ²J_{2-H}^{proS},_{2-H}^{proR} = 10.9 Hz, 1 H, 2-H^{proS}),

3.03 ppm (dd, $^2J_{2-H^{proR},2-H^{proS}} = 10.9$ Hz, $^3J_{2-H^{proR},3-H} = 6.3$ Hz, 1 H, 2- H^{proR}), 1.29 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃), 1.28 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃).

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO-d₆); δ = 168.3 ppm (3-CO), 168.1 ppm (Gly-CO), 165.6 ppm (5-CO), 108.8 ppm (Isopr.-quart.), 76.5 ppm (8-C), 75.2 ppm (7-C), 63.3 ppm (3-C), 59.8 ppm (8a-C), 55.4 ppm (6-C), 42.6 ppm (α -C), 30.7 ppm (2-C), 26.3 ppm (Isopr.-CH₃), 24.1 ppm (Isopr.-CH₃).

HRMS (ESI): für C₂₆H₃₄N₆O₁₀S₂Na⁺ (M+Na⁺), ber.: 677.1664, gef.: 677.1670.

zyklo-[Pli=Cat-Gly]₂ (**13**)



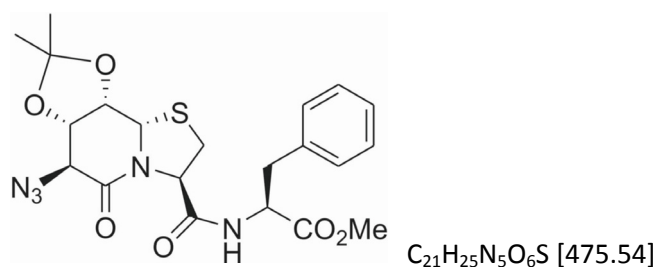
C₂₆H₃₄N₆O₁₀S₂ [574.11]

50 mg (0.07 mmol) der Verbindung (**13**) wurden in 2.00 mL TFA/Wasser 95:5 gelöst, nach zwei Stunden bei Raumtemperatur wurde das Zylopeptid in Diethylether ausgefällt. Das Peptid wurde abzentrifugiert und noch drei Mal mit Diethylether gewaschen. Anschließend wurde der farblose Niederschlag am Hochvakuum getrocknet. Es wurden 40 mg (0.07 mmol, 99%) des gewünschten Produkts erhalten.

¹H-NMR: (600 MHz, DMSO-d₆); δ = 9.25 ppm (d, $^3J_{6-NH,6-H} = 6.7$ Hz, 1 H, 6-NH), 7.46 ppm (t, $^3J_{Gly-NH,\alpha-H} = 2.6$ Hz, 1 H, Gly-NH), 5.50 ppm (d, $^3J_{8-OH,8-H} = 4.7$ Hz, 1H, 8-OH), 5.32 ppm (d, $^3J_{7-OH,7-H} = 4.7$ Hz, 1H, 7-OH), 5.11 ppm (dd, $^3J_{3-H,2-H^{proR}} = 6.4$ Hz, $^3J_{3-H,2-H^{proS}} = 1.9$ Hz, 1 H, 3-H), 4.98 ppm (d, $^3J_{8a-H,8-H} = 1.5$ Hz, 1 H, 8a-H), 3.94 ppm (ddd, $^3J_{7-H,6-H} = 8.7$ Hz, $^3J_{7-H,7-OH} = 6.8$ Hz, $^3J_{7-H,8-H} = 2.3$ Hz, 1 H, 7-H), 3.90 ppm (dd, $^2J_{\alpha-H,\alpha-H} = 17.6$ Hz, $^3J_{\alpha-H,Gly-NH} = 4.0$ Hz, 1 H, α^T -H), 3.85 ppm (ddd, $^3J_{8-H,8-OH} = 4.7$ Hz, $^3J_{8-H,7-H} = 2.3$ Hz, $^3J_{8-H,8a-H} = 1.5$ Hz, 1 H, 8-H), 3.74 ppm (dd, $^2J_{\alpha-H,\alpha-H} = 17.6$ Hz, $^3J_{\alpha-H,Gly-NH} = 3.1$ Hz, 1 H, α^H -H), 3.33 ppm (dd, $^3J_{6-H,7-H} = 8.5$ Hz, $^3J_{6-H,6-NH} = 6.6$ Hz, 1 H, 6-H), 3.20 ppm (d, $^2J_{2-H^{proS},2-H^{proR}} = 10.8$ Hz, $^3J_{2-H^{proR},3-H} = 2.3$ Hz, 1 H, 2- H^{proS}), 2.98 ppm (dd, $^2J_{2-H^{proR},2-H^{proS}} = 10.8$ Hz, $^3J_{2-H^{proR},3-H} = 6.6$ Hz, 1 H, 2- H^{proR}).

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO-d₆); δ = 168.5 ppm (3-CO), 167.7 ppm (Gly-CO), 167.6 ppm (5-CO), 70.2 ppm (8-C/7-C), 63.3 ppm (8a-C), 63.2 ppm (3-C), 56.3 ppm (6-C), 42.9 ppm (α -C), 30.4 ppm (2-C).

HRMS (ESI): für C₂₀H₂₆N₆O₁₀S₂Na⁺ (M+Na⁺), ber.: 597.1044, gef.: 597.1043.

(6S)-azido-Pli^P=Cat-Phe-OMe (14)

860 mg (2.6 mmol, 1.0 eq) der Verbindung **(5)** wurden in 5.00 mL 1,4-Dioxan gelöst, es erfolgte die Zugabe von 5 mL (5.0 mmol, 1.9 eq) 1N LiOH. Durch DC-Kontrolle (DCM/EE 2:1) wurde der Reaktionsfortschritt verfolgt. Nach vollständiger Hydrolyse des Esters wurde mit 1N HCl neutralisiert, das Lösungsmittel entfernt und der Ansatz am Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde in 10.0 mL DMF aufgenommen, es wurden 979 mg (2.6 mmol, 1.0 eq) HBTU, 395 mg (2.6 mmol, 1.0 eq) HOBT und 555 mg (2.6 mmol, 1.0 eq) Phenylalaninmethylester-HCl zugegeben. Der pH-Wert wurde durch DIPEA-Zugabe auf pH = 8 eingestellt und der Ansatz für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand mit 100 mL DCM aufgenommen und gegen jeweils 50.0 mL Salzsäure ($c = 0.5 \text{ mol/L}$), gesättigte NaHCO_3 -Lösung sowie gesättigte NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde abschließend säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/EE 3:1). Es wurden 574 mg (1.21 mmol, 47%) der Verbindung **(14)** in Form eines farblosen Pulvers erhalten.

Schmp.: 47.0°C.

¹H-NMR: (600 MHz, DMSO-d_6); $\delta = 8.24 \text{ ppm}$ (d, $^3J_{\text{Phe-NH, Phe-}\alpha} = 7.5 \text{ Hz}$, 1 H, Phe-NH), 7.32-7.19 ppm (m, 5 H, Ar-H), 5.09 ppm (dd, $^3J_{3\text{-H, 2-H}^{\text{proR}}} = 6.6 \text{ Hz}$, $^3J_{3\text{-H, 2-H}^{\text{proS}}} = 1.2 \text{ Hz}$, 1 H, 3-H), 5.08 ppm (d, $^3J_{8\text{a-H, 8-H}} = 1.9 \text{ Hz}$, 1 H, 8a-H), 4.54 ppm (dd, $^3J_{8\text{-H, 7-H}} = 7.1 \text{ Hz}$, $^3J_{8\text{-H, 8a-H}} = 1.9 \text{ Hz}$, 1 H, 8-H), 4.50 ppm (ddd, $^3J_{\text{Phe-}\alpha, \text{Phe-}\beta^{\text{proR}}} = 7.9 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{Phe-}\alpha, \text{Phe-NH}} = 7.7 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{Phe-}\alpha, \text{Phe-}\beta^{\text{proS}}} = 5.8 \text{ Hz}$, 1 H, Phe- α), 4.49 ppm (dd, $^3J_{7\text{-H, 8-H}} = 7.1 \text{ Hz}$, $^3J_{7\text{-H, 6-H}} = 2.4 \text{ Hz}$, 1 H, 7-H), 4.43 ppm (d, $^3J_{6\text{-H, 7-H}} = 2.2 \text{ Hz}$, 1 H, 6-H), 3.59 ppm (s, 3 H, CO_2CH_3), 3.23 ppm (dd, $^2J_{2\text{-H}^{\text{proS}}, 2\text{-H}^{\text{proR}}} = 11.4 \text{ Hz}$, $^3J_{2\text{-H}^{\text{proS}}, 3\text{-H}} = 1.3 \text{ Hz}$, 1 H, 2-H^{proS}), 3.22 ppm (dd, $^2J_{\beta\text{-H}^{\text{proS}}, \beta\text{-H}^{\text{proR}}} = 13.6 \text{ Hz}$, $^3J_{\beta^{\text{proS}}\text{-H, Phe-}\alpha} = 6.1 \text{ Hz}$, 1 H, $\beta\text{-H}^{\text{proS}}$), 3.17 ppm (dd, $^2J_{2\text{-H}^{\text{proR}}, 2\text{-H}^{\text{proS}}} = 11.4 \text{ Hz}$, $^3J_{2\text{-H}^{\text{proR}}, 3\text{-H}} = 6.6 \text{ Hz}$, 1 H, 2-H^{proR}), 3.16 ppm (dd, $^2J_{\beta\text{-H}^{\text{proR}}, \beta\text{-H}^{\text{proS}}} = 13.8 \text{ Hz}$, $^3J_{\beta^{\text{proR}}\text{-H, Phe-}\alpha} = 8.0 \text{ Hz}$, 1 H, $\beta\text{-H}^{\text{proR}}$), 1.28 ppm (s, 3 H, Isopr.- CH_3^{t}), 1.25 ppm (s, 3 H, Isopr.- CH_3^{h}).

¹³C-NMR: (150 MHz, DMSO-d_6); $\delta = 171.5 \text{ ppm}$ (CO_2CH_3), 168.4 ppm (3-CO), 163.8 ppm (5-CO), 136.7 ppm (Ar-quart.), 129.1 ppm (Ar. o-C), 128.3 ppm (Ar. m-C), 126.6 ppm (Ar. p-C), 108.8 ppm (Isopr.-quart.), 75.3 ppm (8-C), 74.3 ppm (7-C), 62.0 ppm (3-C), 61.1 ppm (6-C), 60.5 ppm (8a-C), 53.8 ppm ($\alpha\text{-C}$), 51.9 ppm (CO_2CH_3), 36.5 ppm ($\beta\text{-C}$), 31.9 ppm (2-C), 26.1 ppm (Isopr.- CH_3), 24.0 ppm (Isopr.- CH_3).

HRMS (ESI): für $C_{21}H_{25}N_5O_6S Na^+$ ($M+Na^+$), ber.: 498.1423, gef.: 498.1420.

CHN-Analyse: ber.: C: 53.04% H: 5.30% N: 14.73%

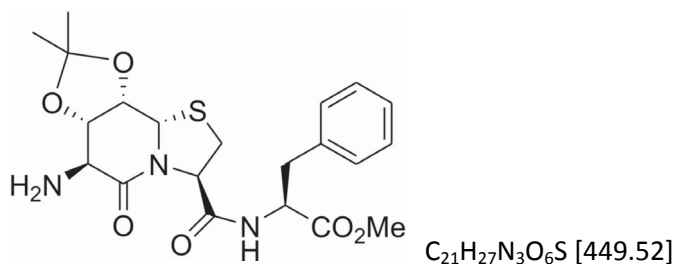
gef.: C: 52.63% H: 5.34% N: 14.24%.

IR (KBr): $\hat{\nu}$ = 3419 br, 2926 s, 2112 s, 1746 s, 1683 s, 1520 m, 1414 m, 1376 m, 1213 m, 1066 m, 982 w, 885 m.

Drehwert: $[\alpha]_D^{16.0} = -163.5$, $[\alpha]_{578}^{16.0} = -171.5$, $[\alpha]_{546}^{16.0} = -197.1$, $[\alpha]_{436}^{16.0} = -357.9$, $[\alpha]_{365}^{16.0} = -603.5$,

(c = 0.996 g/100 mL, MeOH).

(6S)-amino-Pli^P=Cat-Phe-OMe (15)



550 mg (1.16 mmol) der Verbindung **(14)** wurden in 4.0 mL Methanol gelöst und mit 55.0 mg Palladium auf Aktivkohle (10%ig) versetzt. Der Ansatz wurde für drei Stunden unter einer Wasserstoffatmosphäre von 1 bar gerührt (DC-Kontrolle). Zum Abtrennen des Katalysators wurde über Kieselgur filtriert, das Filtrat eingeeengt und am Hochvakuum getrocknet. Es wurden 490 mg (1.09 mmol, 94%) der Verbindung **(15)** als farbloser Feststoff erhalten

Schmp.: 61.0 °C.

¹H-NMR: (600 MHz, DMSO- d_6); δ = 7.86 ppm (d, $^3J_{\text{Phe-NH}, \text{Phe-}\alpha}$ = 7.4 Hz, 1 H, Phe-NH), 7.29-7.18 ppm (m, 5 H, Ar-H), 5.38 ppm (d, $^3J_{8a-H, 8-H}$ = 2.0 Hz, 1 H, 8a-H), 5.06 ppm (dd, $^3J_{3-H, 2-H^{\text{proR}}}$ = 5.7 Hz, $^3J_{3-H, 2-H^{\text{proS}}}$ = 1.7 Hz, 1 H, 3-H), 4.48 ppm (dd, $^3J_{8-H, 7-H}$ = 7.1 Hz, $^3J_{8-H, 8a-H}$ = 1.8 Hz, 1 H, 8-H), 4.47 ppm (dd, $^3J_{7-H, 8-H}$ = 7.1 Hz, $^3J_{7-H, 6-H}$ = 1.8 Hz, 1 H, 7-H), 4.47 ppm (ddd, $^3J_{\text{Phe-}\alpha, \text{Phe-}\beta^{\text{proR}}}$ = 7.9 Hz, $^3J_{\text{Phe-}\alpha, \text{Phe-NH}}$ = 7.9 Hz, $^3J_{\text{Phe-}\alpha, \text{Phe-}\beta^{\text{proS}}}$ = 5.9 Hz, 1 H, Phe- α), 4.31 ppm (dd, $^3J_{6-H, 6-NH}$ = 7.2 Hz, $^3J_{6-H, 7-H}$ = 2.2 Hz, 1 H, 6-H), 3.62 ppm (s, 3 H, CO₂CH₃), 3.05 ppm (dd, $^2J_{2-H^{\text{proS}}, 2-H^{\text{proR}}}$ = 11.3 Hz, $^3J_{2-H^{\text{proS}}, 3-H}$ = 1.9 Hz, 1 H, 2-H^{proS}), 3.02 ppm (dd, $^2J_{2-H^{\text{proR}}, 2-H^{\text{proS}}}$ = 11.3 Hz, $^3J_{2-H^{\text{proR}}, 3-H}$ = 5.6 Hz, 1 H, 2-H^{proR}), 2.98 ppm (dd, $^2J_{\beta-H^{\text{proS}}, \beta-H^{\text{proR}}}$ = 13.8 Hz, $^3J_{\beta^{\text{proS}}, H, \text{Phe-}\alpha}$ = 5.2 Hz, 1 H, β -H^{proS}), 2.97 ppm (dd, $^2J_{\beta-H^{\text{proR}}, \beta-H^{\text{proS}}}$ = 13.8 Hz, $^3J_{\beta^{\text{proR}}, H, \text{Phe-}\alpha}$ = 8.7 Hz, 1 H, β -H^{proR}), 1.25 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃^t), 1.22 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃^h).

¹³C-NMR: (150 MHz, DMSO- d_6); δ = 172.0 ppm (CO₂CH₃), 170.1 ppm (3-CO), 169.5 ppm (5-CO), 137.4 ppm (Ar-_{quart.}), 129.6 ppm (Ar. o-C), 128.7 ppm (Ar. m-C), 127.0 ppm (Ar. p-C), 108.4 ppm (Isopr.-_{quart.}), 77.4 ppm (6-C), 76.9 ppm (7/8-C), 62.7 ppm (3-C), 60.6 ppm (8a-C), 54.3 ppm (α -C), 52.4 ppm (CO₂CH₃), 36.8 ppm (β -C), 31.6 ppm (2-C), 26.8 ppm (Isopr.-CH₃), 24.4 ppm (Isopr.-CH₃).

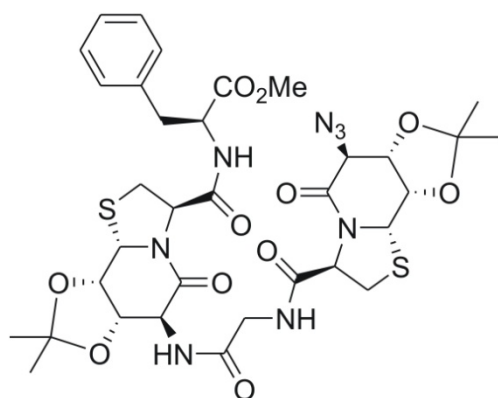
HRMS (ESI): für $C_{21}H_{27}N_3O_6S Na^+$ ($M+Na^+$), ber.: 472.1518, gef.: 472.1696.

CHN-Analyse: ber.: C: 56.11% H: 6.05% N: 9.35%
gef.: C: 54.92% H: 5.88% N: 9.01%.

IR (KBr): $\hat{\nu}$ = 3374 br, 2988 s, 2951 s, 1744 s, 1678 s, 1213 m.

Drehwert: $[\alpha]_D^{15.5} = -105.4$, $[\alpha]_{578}^{15.5} = -110.4$, $[\alpha]_{546}^{15.5} = -126.5$, $[\alpha]_{436}^{15.5} = -224.9$, $[\alpha]_{365}^{15.5} = -361.3$,
(c = 1.042 g/100 mL, MeOH).

(6S)-azido-Pli^P=Cat-Gly-Pli^P=Cat-Phe-OMe (16)



$C_{34}H_{42}N_8O_{11}S_2$ [802.87]

385 mg (1.00 mmol, 1.0 eq) der Verbindung **(9)** wurde in 5.00 mL Methanol gelöst, anschließend wurden 2.00 mL (2.00 mmol, 2.0 eq) 1N LiOH zugegeben und bei Raumtemperatur gerührt. Mittels DC-Kontrolle (DCM/EE 2:1) wurde der Reaktionsfortschritt kontrolliert. Nach vollständiger Hydrolyse des Esters wurde mit 1N HCl neutralisiert, das Lösungsmittel entfernt und der Ansatz am Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde in 10.0 mL DMF aufgenommen, es folgte die Zugabe von 454 mg (1.01 mmol, 1.0 eq) der Verbindung **(15)**, 155 mg (1.00 mmol, 1.0 eq) HOBt und 384 mg (1.00 mmol, 1.0 eq) HBTU. Der pH-Wert der Lösung wurde mit DIPEA auf pH = 8 eingestellt und der Ansatz bei Raumtemperatur für 16 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand mit 100 ml DCM aufgenommen und gegen jeweils 50.0 mL Salzsäure (c = 0.5 mol/L), gesättigte $NaHCO_3$ -Lösung sowie gesättigte NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Das Produkt wurde flashchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 15:1), dabei wurden 231 mg (0.29 mmol, 29%) der Verbindung **(16)** als farbloser Feststoff erhalten.

Schmp.: 117.0 °C.

1H -NMR: (600 MHz, $DMSO-d_6$); δ = 8.23-8.20 ppm (m, 3 H, 3x NH), 7.28-7.18 ppm (m, 5H, Ar-H), 5.20 ppm (d, $^3J_{8a'-H,8'-H} = 1.8$ Hz, 1 H, 8a'-H), 5.13 ppm (d, $^3J_{8a-H,8-H} = 1.8$ Hz, 1 H, 8a-H), 5.08 ppm (dd, $^3J_{3-H,2-H}^{proR} = 6.3$ Hz, $^3J_{3-H,2-H}^{proS} = 1.6$ Hz, 1 H, 3-H), 5.05 ppm (dd, $^3J_{3'-H,2'-H}^{proR} = 6.6$ Hz, $^3J_{3'-H,2'-H}^{proS} = 1.1$ Hz, 1 H, 3'-H), 4.56 ppm (dd, $^3J_{8-H,7-H} = 7.1$ Hz, $^3J_{8-H,8a-H} = 2.0$ Hz, 1 H, 8-H), 4.51 ppm (dd, $^3J_{8'-H,7'-H} = 7.0$ Hz, $^3J_{8'-H,8a'-H} = 1.9$ Hz, 1 H, 8'-H), 4.50 ppm (dd, $^3J_{7-H,8-H} = 7.0$ Hz, $^3J_{7-H,6-H} = 2.3$ Hz, 1 H, 7-H), 4.46 ppm (dd, $^3J_{7'-H,8'-H} = 7.1$ Hz, $^3J_{7'-H,6'-H} = 1.9$ Hz, 1 H, 7'-H), 4.44 ppm (d, $^3J_{6-H,7-H} = 2.2$ Hz, 1 H,

6-H), 4.42 ppm (ddd, $^3J_{\text{Phe-}\alpha,\text{Phe-}\beta^{\text{proR}}} = 7.9 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{Phe-}\alpha,\text{Phe-}\beta^{\text{proS}}} = 5.9 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{Phe-}\alpha,\text{Phe-NH}} = 1.9 \text{ Hz}$, 1 H, Phe- α), 4.24 ppm (dd, $^3J_{6'-\text{H},6'-\text{NH}} = 7.1 \text{ Hz}$, $^3J_{6'-\text{H},7'-\text{H}} = 1.9 \text{ Hz}$, 1 H, 6'-H), 3.86 ppm (dd, $^2J_{\alpha-\text{H},\alpha-\text{H}} = 16.8 \text{ Hz}$, $^3J_{\alpha-\text{H},\text{Gly-NH}} = 5.8 \text{ Hz}$, 1 H, $\alpha^{\text{T}}\text{-H}$), 3.73 ppm (dd, $^2J_{\alpha-\text{H},\alpha-\text{H}} = 16.8 \text{ Hz}$, $^3J_{\alpha-\text{H},\text{Gly-NH}} = 5.3 \text{ Hz}$, 1 H, $\alpha^{\text{H}}\text{-H}$), 3.56 ppm (s, 3 H, OMe), 3.15-2.98 ppm (m, 6H, $\beta\text{-H}/2\text{-H}/2'\text{-H}$), 1.28 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃), 1.27 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃), 1.26 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃), 1.26 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃).

¹³C-NMR: (150 MHz, DMSO_{d6}); δ = 171.4 ppm (Phe-CO₂Me), 168.9 ppm (Gly-CO), 168.8 ppm (3-C/3'-C), 165.0 ppm (5'-CO), 163.9 ppm (5-CO), 136.9 ppm (Ar._{quart.}), 129.1 ppm (Ar. o-C), 128.2 ppm (Ar. m-C), 126.5 ppm (Ar. p-C), 108.8 ppm (Isopr._{quart.}), 108.5 (Isopr._{quart.}), 76.1 ppm (7'-C), 75.2 ppm (7-C), 75.2 ppm (8'-C), 74.3 ppm (8-C), 62.7 ppm (3'-C), 62.2 ppm (3-C), 61.1 ppm (6-C), 60.5 ppm (8a-C), 60.2 ppm (8a'-C), 54.9 ppm (Phe- α -C), 54.1 ppm (6'-C), 51.8 ppm (OCH₃), 42.4 ppm (Gly- α -C), 36.4 ppm (Phe- β -C), 32.1 ppm (2-C), 31.5 ppm (2'-C), 26.2 ppm (Isopr.-CH₃), 26.1 ppm (Isopr.-CH₃), 24.0 ppm (Isopr.-CH₃), 23.9 ppm (Isopr.-CH₃).

HRMS (ESI): für C₃₄H₄₂N₈O₁₁S₂Na⁺ (M+Na⁺), ber.: 825.2312, gef.: 825.1755.

CHN-Analyse: ber.: C: 50.86% H: 5.27% N: 13.96%.

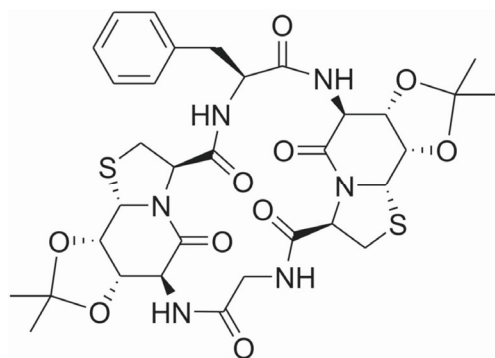
gef.: C: 50.15% H: 5.55% N: 13.67%.

IR (KBr): $\hat{\nu}$ = 3318 m, 2112 s, 1745 m, 1676 s, 1530 m, 1413 m, 1377 m, 1212 s, 1163 m, 1066 m.

Drehwert: $[\alpha]_{\text{D}}^{18.5} = -149.6$, $[\alpha]_{578}^{18.5} = -156.7$, $[\alpha]_{546}^{18.5} = -180.2$, $[\alpha]_{436}^{18.5} = -326.6$, $[\alpha]_{365}^{18.5} = -545.6$,

(c = 1.015 g/100 mL, MeOH).

zyklo-[Pli^P=Cat-Gly-Pli^P=Cat-Phe] (17)



C₃₃H₄₀N₆O₁₀S₂ [744.22]

Der lineare Vorläufer der Verbindung wurde mittels Festphasensynthese in 0.2 millimolarem Maßstab entsprechend dem **Festphasenprotokoll II** dargestellt. Die Abspaltung vom Harz erfolgte mit DCM/TFE/HOAc 7:2:1 über einen Zeitraum von 90 Minuten. Das Peptid wurde in Diethylether gefällt, abzentrifugiert und anschließend zwei Mal mit Ether gewaschen.

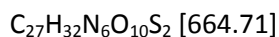
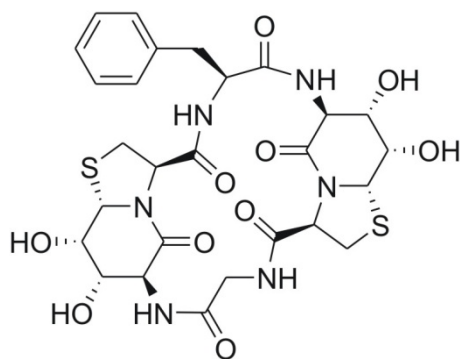
Das offenkettige Hexapeptid wurde in 155 mL DMF gelöst und auf 4 °C herabgekühlt, es wurden 38 mg (0.45 mmol, 3.0 eq) NaHCO₃ und 97 μ L (0.45 mmol, 3.0 eq) DPPA zugegeben. Der Ansatz wurde für fünf Tage bei 4 °C und einen Tag bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch

Zugabe von 1 mL Wasser abgebrochen, anschließend wurde der Ansatz filtriert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in wenig MeOH/DCM 1:1 aufgenommen und in Diethylether gefällt, dieser Schritt wurde zwei Mal wiederholt. Der am Hochvakuum getrocknete Rückstand wurde flashchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 10:1 → 5:1), dabei wurden 78.0 mg (0.10 mmol, 67%) der Verbindung (**17**) als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO_{d6}); δ = 8.80 ppm (d, $^3J_{6'-\text{NH},6'-\text{H}}$ = 3.6 Hz, 1 H, 6'-NH), 8.67 ppm (d, $^3J_{6-\text{NH},6-\text{H}}$ = 5.4 Hz, 1 H, 6-NH), 7.89 ppm (dd, $^3J_{\text{Gly-NH},\alpha-\text{H}}$ = 6.9 Hz, $^3J_{\text{Gly-NH},\alpha-\text{H}}$ = 2.4 Hz, 1 H, Gly-NH), 7.29-7.20 ppm (m, 6H, Phe-CH/Phe-NH), 5.31 ppm (d, $^3J_{8a-\text{H},8-\text{H}}$ = 1.9 Hz, 1 H, 8a-H), 5.11 ppm (dd, $^3J_{3-\text{H},2-\text{H}^{\text{proR}}}$ = 5.9 Hz, $^3J_{3-\text{H},2-\text{H}^{\text{proS}}}$ = 1.7 Hz, 1 H, 3-H), 5.03 ppm (d, $^3J_{3'-\text{H},2'-\text{H}^{\text{proR}}}$ = 6.2 Hz, 1 H, 3'-H), 4.58-4.52 ppm (m, 3H, 7-H/8-H/ α -Phe), 4.46 ppm (dd, $^3J_{8'-\text{H},7'-\text{H}}$ = 7.0 Hz, $^3J_{8'-\text{H},8a'-\text{H}}$ = 2.1 Hz, 1 H, 8'-H), 4.37 ppm (d, $^3J_{8a'-\text{H},8'-\text{H}}$ = 2.0 Hz, 1 H, 8a'-H), 4.23 ppm (dd, $^3J_{7'-\text{H},8'-\text{H}}$ = 7.0 Hz, $^3J_{7'-\text{H},6'-\text{H}}$ = 2.0 Hz, 1 H, 7'-H), 4.05 ppm (dd, $^2J_{\alpha-\text{H},\alpha-\text{H}}$ = 16.1 Hz, $^3J_{\alpha-\text{H},\text{Gly-NH}}$ = 7.0 Hz, 1 H, α^{T} -H), 3.96 ppm (dd, $^3J_{6-\text{H},6-\text{NH}}$ = 4.9 Hz, $^3J_{6-\text{H},7-\text{H}}$ = 2.2 Hz, 1 H, 6-H), 3.70 ppm (dd, $^3J_{6'-\text{H},6'-\text{NH}}$ = 3.4 Hz, $^3J_{6'-\text{H},7'-\text{H}}$ = 1.9 Hz, 1 H, 6'-H), 3.45 ppm (dd, $^2J_{\alpha-\text{H},\alpha-\text{H}}$ = 16.1 Hz, $^3J_{\alpha-\text{H},\text{Gly-NH}}$ = 2.5 Hz, 1 H, α^{H} -H), 3.15 ppm (d, $^2J_{2'-\text{H}^{\text{proS}},2'-\text{H}^{\text{proR}}}$ = 10.8 Hz, 1 H, 2'-H^{proS}), 3.13-3.08 ppm (m, 2H, 2-H), 3.03-2.99 ppm (m, 2H, β -H), 2.97 ppm (dd, $^2J_{2'-\text{H}^{\text{proR}},2'-\text{H}^{\text{proS}}}$ = 10.8 Hz, $^3J_{2'-\text{H}^{\text{proR}},3'-\text{H}}$ = 6.3 Hz, 1 H, 2'-H^{proR}), 1.30 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃), 1.28 ppm (s, 6 H, Isopr.-CH₃), 1.25 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃).

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO_{d6}); δ = 169.1 ppm (Phe-CO), 168.2 ppm (3'-CO), 168.0 ppm (3-CO), 167.8 ppm (Gly-CO), 166.1 ppm (5'-CO), 164.0 ppm (5-CO), 136.2 ppm (Arom.-C), 129.2 ppm (Arom.-C), 128.0 ppm (Arom.-C), 126.6 ppm (Arom.-C), 108.8 ppm (Isopr._{quart.}), 108.4 ppm (Isopr'_{quart.}), 76.3 ppm (8-C), 75.7 ppm (8'-C), 75.4 ppm (7'-C), 75.1 ppm (7-C), 63.3 ppm (3'-C), 63.0 ppm (3-C), 59.8 ppm (8a'-C), 59.6 ppm (8a-C), 55.7 ppm (6'-C), 54.8 ppm (6-C), 53.7 ppm (Phe- α), 42.2 ppm (Gly- α), 37.5 ppm (Phe- β), 31.2 ppm (2-C), 31.1 ppm (2'-C), 26.2 ppm (Isopr.-CH₃), 26.0 ppm (Isopr.-CH₃), 24.0 ppm (Isopr.-CH₃), 23.8 ppm (Isopr.-CH₃).

HRMS (ESI): für C₃₃H₄₀N₆O₁₀S₂Na⁺ (M+Na⁺), ber.: 767.2140, gef.: 767.2146.

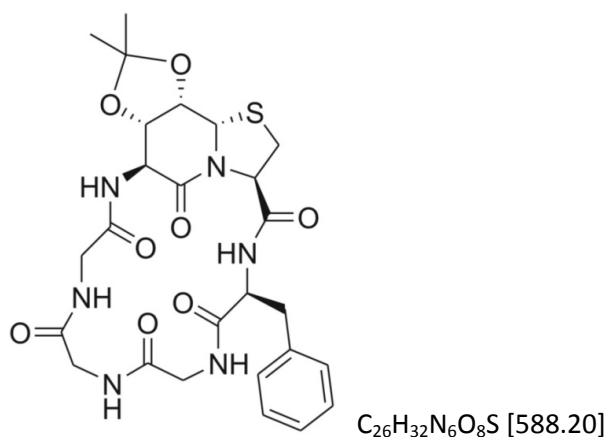
zyklo-[Pli=Cat-Gly-Pli=Cat-Phe] (18)

6 mg (9.00 μmol) der Verbindung (**17**) wurden in 1.00 mL TFA/Wasser 95:5 gelöst, nach zwei Stunden bei Raumtemperatur wurde das Zylopeptid in Diethylether ausgefällt. Das Peptid wurde abzentrifugiert und noch drei Mal mit Diethylether gewaschen. Anschließend wurde der farblose Niederschlag am Hochvakuum getrocknet. Es wurden 6 mg (9.00 μmol , 99%) des gewünschten Produkts erhalten.

$^1\text{H-NMR}$: (600 MHz, DMSO-d_6); δ = 9.33 ppm (d, $^3J_{6\text{-NH},6\text{-H}}$ = 6.8 Hz, 1 H, 6-NH), 9.22 ppm (d, $^3J_{6\text{-NH},6\text{-H}}$ = 6.3 Hz, 1 H, 6-NH), 7.57 ppm (d, $^3J_{\text{Phe-NH},\text{Phe}\alpha\text{-H}}$ = 6.3 Hz, 1 H, Phe-NH), 7.32-7.29 ppm (m, 1 H, Gly-NH), 7.27-7.15 ppm (m, 5H, Phe-CH), 5.54-5.48 ppm (m, 2H, OH), 5.34-5.31 ppm (m, 1H, OH), 5.17 ppm (dd, $^3J_{3\text{-H},2\text{-H}^{\text{ProR}}}$ = 6.6 Hz, $^3J_{3\text{-H},2\text{-H}^{\text{ProS}}}$ = 1.2 Hz, 1 H, 3-H), 5.15 ppm (d, $^3J_{\text{OH},6\text{-NH}}$ = 6.1 Hz, 1 H, OH), 5.11 ppm (d, $^3J_{3\text{-H},2\text{-H}^{\text{ProR}}}$ = 6.6 Hz, 1 H, 3-H), 4.87 ppm (s, 1 H, 8a-H), 4.79 ppm (s, 1 H, 8a-H), 4.62-4.58 ppm (m, 1 H, Phe α -H), 4.01 ppm (dd, $^2J_{\alpha\text{-H},\alpha\text{-H}}$ = 17.8 Hz, $^3J_{\alpha\text{-H},\text{Gly-NH}}$ = 5.8 Hz, 1 H, Gly α -H), 3.89-3.81 ppm (m, 4 H, 7-H/8-H), 3.57 ppm (dd, $^2J_{\alpha\text{-H},\alpha\text{-H}}$ = 17.8 Hz, 1 H, Gly α -H), 3.31-3.26 ppm (m, 2 H, 6-H), 3.22-3.15 ppm (m, 3 H, Phe β -H/2-H), 2.99-2.90 ppm (m, 2 H, 2-H), 2.85 ppm (dd, $^2J_{\beta\text{-H},\beta\text{-H}}$ = 13.7 Hz, $^3J_{\beta\text{-H},\text{Phe-NH}}$ = 4.7 Hz, 1 H, Phe β -H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (150 MHz, DMSO-d_6); δ = 169.4 ppm (Phe-CO), 168.5 ppm (3-CO), 168.3 ppm (3-CO), 167.5 ppm (5-CO), 167.4 ppm (Gly-CO), 167.2 ppm (5-CO), 70.6-69.8 ppm (8-C/7-C), 63.4-63.3 ppm (3-C), 62.9-62.8 ppm (8a-C), 56.1-56.0 ppm (6-C), 42.6 ppm (Gly α -C), 38.3 ppm (Phe α -C), 31.0 ppm (2-C), 30.2 ppm (2-C).

HRMS (ESI): für $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_{10}\text{S}_2\text{Na}^+$ ($\text{M}+\text{Na}^+$), ber.: 687.1514, gef.: 687.1516.

zyklo-[Pli^P=Cat-Phe-Gly-Gly-Gly] (19)

Der lineare Vorläufer der Verbindung wurde mittels Festphasensynthese in 0.2 millimolarem Maßstab entsprechend dem **Festphasenprotokoll II** dargestellt. Die Abspaltung vom Harz erfolgte mit DCM/TFE/HOAc 7:2:1 über einen Zeitraum von 90 Minuten. Das Peptid wurde in Diethylether gefällt, abzentrifugiert und anschließend zwei Mal mit Ether gewaschen. Das offenkettige Hexapeptid wurde in 165 mL DMF gelöst und auf 4 °C herabgekühlt, es wurden 42.0 mg (0.48 mmol, 3.0 eq) NaHCO_3 und 107 μL (0.48 mmol, 3.0 eq) DPPA zugegeben. Der Ansatz wurde für sieben Tage bei 4 °C und einen Tag bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 mL Wasser abgebrochen, anschließend wurde der Ansatz filtriert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in wenig MeOH/DCM 1:1 aufgenommen und in Diethylether gefällt, dieser Schritt wurde zwei Mal wiederholt. Der am Hochvakuum getrocknete Rückstand wurde zwei Mal flashchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 10:1; R_f = 0.14), anschließend wurde der Rückstand zuerst in Wasser, dann in Methanol suspendiert und anschließend abzentrifugiert. Nach dem Trocknen am Hochvakuum wurden 30.0 mg (0.05 mmol, 31%) der Verbindung **(19)** als farbloser Feststoff erhalten.

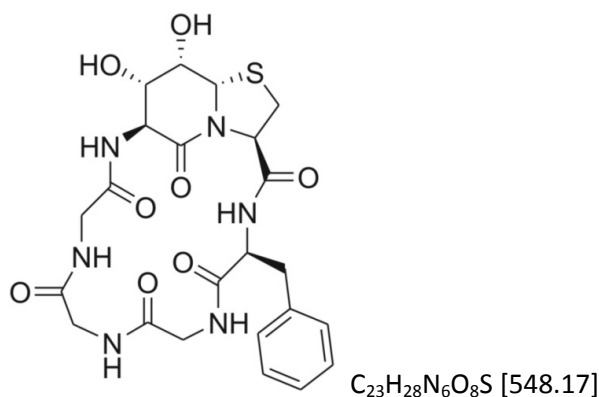
¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d_6); δ = 8.90 ppm (t, $^3J_{\text{Gly}^{\text{A-NH}},\alpha^{\text{A-H}}} = 5.4$ Hz, 1 H, $\text{Gly}^{\text{A-NH}}$), 8.54 ppm (t, $^3J_{\text{Gly}^{\text{B-NH}},\alpha^{\text{B-H}}} = 6.1$ Hz, 1 H, $\text{Gly}^{\text{B-NH}}$), 8.14 ppm (d, $^3J_{6\text{-NH},6\text{-H}} = 5.1$ Hz, 1 H, 6-NH), 7.71 ppm (dd, $^3J_{\text{Gly}^{\text{C-NH}},\alpha^{\text{C-H}}} = 8.1$ Hz, $^3J_{\text{Gly}^{\text{C-NH}},\alpha^{\text{C-H}}} = 2.3$ Hz, 1 H, $\text{Gly}^{\text{C-NH}}$), 7.24-7.10 ppm (m, 6 H, Phe-NH/Phe-Ar.), 5.11 ppm (dd, $^3J_{8\text{a-H},8\text{-H}} = 1.8$ Hz, 1 H, 8a-H), 5.04 ppm (dd, $^3J_{3\text{-H},2\text{-H}^{\text{proR}}} = 6.3$ Hz, $^3J_{3\text{-H},2\text{-H}^{\text{proS}}} = 2.1$ Hz, 1 H, 3-H), 4.55 ppm (dd, $^3J_{8\text{-H},7\text{-H}} = 6.9$ Hz, $^3J_{8\text{-H},8\text{a-H}} = 1.8$ Hz, 1 H, 8-H), 4.51 ppm (dd, $^3J_{7\text{-H},8\text{-H}} = 6.9$ Hz, $^3J_{7\text{-H},6\text{-H}} = 2.0$ Hz, 1 H, 7-H), 4.47 ppm (dd, $^3J_{\text{Phe}\alpha\text{-H},\text{Phe-NH}} = 5.6$ Hz, $^3J_{\text{Phe}\alpha\text{-H},\text{Phe-}\beta\text{H}} = 5.6$ Hz, 1 H, $\text{Phe}\alpha\text{-H}$), 4.08-4.00 ppm (m, 2 H, $\alpha^{\text{C}}/6\text{-H}$), 3.76-3.66 ppm (m, 2 H, α^{B}), 3.61 ppm (dd, $^2J_{\alpha^{\text{A-H}},\alpha^{\text{A-H}}} = 15.5$ Hz, $^3J_{\alpha^{\text{A-H}},\text{Gly}^{\text{A-NH}}} = 6.0$ Hz, 1 H, $\alpha^{\text{A-H}}$), 3.54 ppm (dd, $^2J_{\alpha^{\text{B-H}},\alpha^{\text{B-H}}} = 15.5$ Hz, $^3J_{\alpha^{\text{B-H}},\text{Gly}^{\text{B-NH}}} = 4.8$ Hz, 1 H, $\alpha^{\text{B-H}}$), 3.15 ppm (dd, $^2J_{\alpha^{\text{C-H}},\alpha^{\text{C-H}}} = 16.3$ Hz, $^3J_{\alpha^{\text{C-H}},\text{Gly}^{\text{C-NH}}} = 2.3$ Hz, 1 H, $\alpha^{\text{C-H}}$), 3.11 ppm (dd, $^2J_{2\text{-H}^{\text{proR}},2\text{-H}^{\text{proS}}} = 11.1$ Hz, $^3J_{2\text{-H}^{\text{proR}},3\text{-H}} = 6.3$ Hz, 1 H, 2-H^{proR}), 3.09 ppm (dd, $^2J_{2\text{-H}^{\text{proS}},2\text{-H}^{\text{proR}}} = 11.1$ Hz, $^3J_{2\text{-H}^{\text{proS}},3\text{-H}} = 2.2$ Hz, 1 H, 2-H^{proS}), 3.06 ppm (dd, $^2J_{\text{Phe}\beta\text{-H},\text{Phe}\beta\text{-H}} = 13.7$ Hz, $^3J_{\text{Phe}\beta\text{-H},\text{Phe}\beta\text{-H}} = 5.9$ Hz, 1 H,

Phe β -H), 2.99 ppm (dd, $^2J_{\text{Phe}\beta\text{-H},\text{Phe}\alpha\text{-H}} = 13.7$ Hz, $^3J_{\text{Phe}\beta\text{-H},\text{Phe}\beta\text{-H}} = 5.4$ Hz, 1 H, Phe β -H), 1.28 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃), 1.26 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃).

^{13}C -NMR: (125 MHz, DMSO-d₆); δ = 171.0 ppm (Phe-CO), 169.0 ppm (Gly^A-CO), 168.9 ppm (Gly^B-CO), 168.5 ppm (3-CO), 168.3 ppm (Gly^C-CO), 166.1 ppm (5-CO), 135.9 ppm (Phe-Ar._{C1}), 129.6 ppm (Phe-Ar._{C2/2'/C3/3'}), 127.8 ppm (Phe-Ar._{C2/2'/C3/3'}), 126.5 ppm (Phe-Ar._{C4}), 108.8 ppm (Isopr._{quart.}), 76.1 ppm (8-C), 74.7 ppm (7-C), 62.9 ppm (3-C), 60.3 ppm (8a-C), 54.3 ppm (6-C), 53.6 ppm (Phe- α), 43.7 ppm (Gly^A- α), 42.2 ppm (Gly^B- α), 41.4 ppm (Gly^C- α), 37.4 ppm (Phe- β), 31.3 ppm (2-C), 26.2 ppm (Isopr.-CH₃), 24.0 ppm (Isopr.-CH₃).

HRMS (ESI): für C₂₆H₃₂N₆O₈S Na⁺ (M+Na⁺), ber.: 611.1895, gef.: 611.1893.

zyklo-[Pli=Cat-Phe-Gly-Gly-Gly] (20)



9.00 mg (0.01 mmol) der Verbindung **(19)** wurden in 1.00 mL TFA/Wasser 95:5 gelöst, nach zwei Stunden bei Raumtemperatur wurde das Zylopeptid in Diethylether ausgefällt. Das Peptid wurde abzentrifugiert und noch drei Mal mit Diethylether gewaschen. Anschließend wurde der farblose Niederschlag am Hochvakuum getrocknet. Es wurden 8 mg (0.01 mmol, 99%) des gewünschten Produkts erhalten.

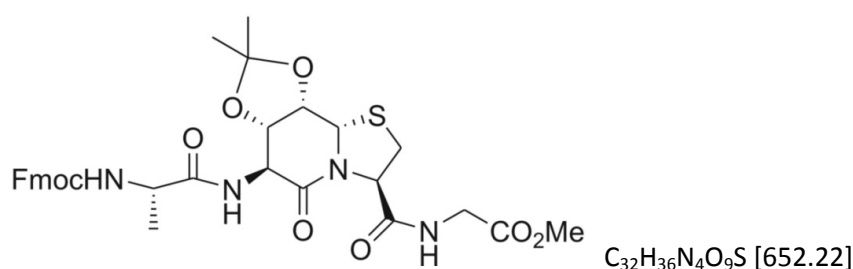
^1H -NMR: (500 MHz, DMSO-d₆); δ = 8.81 ppm (d, $^3J_{6\text{-NH},6\text{-H}} = 6.8$ Hz, 1 H, 6-NH), 8.39 ppm (bs, 1 H, Gly^A-NH), 8.32 ppm (t, $^3J_{\text{Gly}^{\text{B}}\text{-NH},\alpha^{\text{B}}\text{-H}} = 5.8$ Hz, 1 H, Gly^B-NH), 7.83 ppm (d, $^3J_{\text{Phe-NH},\text{Phe}\alpha\text{-H}} = 6.8$ Hz, 1 H, Phe-NH), 7.46 ppm (dd, $^3J_{\text{Gly}^{\text{C}}\text{-NH},\alpha^{\text{C}}\text{-H}} = 5.8$ Hz, $^3J_{\text{Gly}^{\text{C}}\text{-NH},\alpha^{\text{C}}\text{-H}} = 5.8$ Hz, 1 H, Gly^C-NH), 7.32-7.13 ppm (m, 5 H, Phe-Ar.), 5.53 ppm (bs, 1 H, 7/8-OH), 5.29 ppm (bs, 1 H, 7/8-OH), 4.75 ppm (dd, $^3J_{8\text{a-H},8\text{-H}} = 1.8$ Hz, 1 H, 8a-H), 4.73 ppm (dd, $^3J_{3\text{-H},2\text{-H}^{\text{proR}}} = 7.0$ Hz, $^3J_{3\text{-H},2\text{-H}^{\text{proS}}} = 5.6$ Hz, 1 H, 3-H), 4.67 ppm (m, 1 H, Phe α -H), 4.05 ppm (dd, $^3J_{7\text{-H},6\text{-H}} = 9.4$ Hz, $^3J_{7\text{-H},8\text{-H}} = 2.0$ Hz, 1 H, 7-H), 4.00 ppm (dd, $^2J_{\alpha^{\text{C}}\text{-H},\alpha^{\text{C}}\text{-H}} = 17.0$ Hz, $^3J_{\alpha^{\text{C}}\text{-H},\text{Gly}^{\text{C}}\text{-NH}} = 6.2$ Hz, 1 H, $\alpha^{\text{C}}\text{-H}$), 3.96-3.93 ppm (m, 1 H, 8-H), 3.84-3.73 ppm (m, 3 H, 6-H/ $\alpha^{\text{A}}\text{-H}/\alpha^{\text{B}}\text{-H}$), 3.63 ppm (dd, $^2J_{\alpha^{\text{C}}\text{-H},\alpha^{\text{C}}\text{-H}} = 17.0$ Hz, $^3J_{\alpha^{\text{C}}\text{-H},\text{Gly}^{\text{C}}\text{-NH}} = 3.1$ Hz, 1 H, $\alpha^{\text{C}}\text{-H}$), 3.60-3.54 ppm (m, 2 H, $\alpha^{\text{A}}\text{-H}/\alpha^{\text{B}}\text{-H}$), 3.38 ppm (dd, $^2J_{\text{Phe}\beta\text{-H},\text{Phe}\beta\text{-H}} = 14.0$ Hz, $^3J_{\text{Phe}\beta\text{-H},\text{Phe}\alpha\text{-H}} = 6.9$ Hz, 1 H, Phe β -H), 2.98 ppm (dd, $^2J_{2\text{-H}^{\text{proR}},2\text{-H}^{\text{proS}}} = 11.1$ Hz, $^3J_{2\text{-H}^{\text{proR}},3\text{-H}} = 7.3$ Hz, 1 H, 2-H^{proR}), 2.88 ppm (dd, $^2J_{\text{Phe}\beta\text{-H},\text{Phe}\beta\text{-H}} = 13.7$ Hz,

$^3J_{\text{Phe}\beta\text{-H},\text{Phe}\alpha\text{-H}} = 10.7 \text{ Hz}$, 1 H, Phe β -H), 2.58 ppm (dd, $^2J_{2\text{-H}^{\text{proS}},2\text{-H}^{\text{proR}}} = 11.1 \text{ Hz}$, $^3J_{2\text{-H}^{\text{proS}},3\text{-H}} = 5.4 \text{ Hz}$, 1 H, 2-H $^{\text{proS}}$).

^{13}C -NMR: (125 MHz, DMSO-d_6); $\delta = 171.5 \text{ ppm}$ (Phe-CO), 169.9 ppm (Gly $^{\text{A}}$ -CO), 169.3 ppm (Gly $^{\text{B}}$ -CO), 168.8 ppm (Gly $^{\text{C}}$ -CO), 168.3 ppm (3-CO), 166.6 ppm (5-CO), 137.8 ppm (Phe-Ar. $_{\text{C1}}$), 129.2 ppm (Phe-Ar. $_{\text{C2/2'}/\text{C3/3'}}$), 128.0 ppm (Phe-Ar. $_{\text{C2/2'}/\text{C3/3'}}$), 126.2 ppm (Phe-Ar. $_{\text{C4}}$), 69.5 ppm (7-C), 68.0 ppm (8-C), 64.9 ppm (8a-C), 62.7 ppm (3-C), 54.5 ppm (6-C), 53.0 ppm (Phe- α), 43.6 ppm (Gly $^{\text{A}}$ - α), 42.7 ppm (Gly $^{\text{B}}$ - α), 41.8 ppm (Gly $^{\text{C}}$ - α), 38.1 ppm (Phe- β), 30.7 ppm (2-C).

HRMS (ESI): für $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_8\text{S Na}^+$ ($\text{M}+\text{Na}^+$), ber.: 571.1582, gef.: 571.1582.

Fmoc-Ala-Pli $^{\text{P}}$ =Cat-Gly-OMe (**21**)

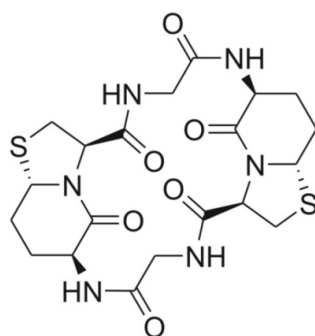


180 mg (50.0 mmol, 1.0 eq) der Verbindung (**10**) wurden in 10.0 mL DMF gelöst, es folgte die Zugabe von 160 mg (50.0 mmol, 1.0 eq) Fmoc-Ala-OH, 80.0 mg (50.0 mmol, 1.0 eq) HOBt und 190 mg (50.0 mmol, 1.0 eq) HBTU. Der pH-Wert der Lösung wurde mit DIPEA auf pH = 8 eingestellt und der Ansatz bei Raumtemperatur für 16 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand mit 100 ml Essigsäureethylester aufgenommen und gegen jeweils 50.0 mL Salzsäure ($c = 0.5 \text{ mol/L}$), gesättigte NaHCO_3 -Lösung sowie gesättigte NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Das Produkt wurde flashchromatographisch aufgereinigt (DCM/EE 2:1 \rightarrow DCM/MeOH 10:1; DC-Kontrolle in DCM/MeOH 10:1 $R_f = 0.51$), dabei wurden 320 mg (49.1 mmol, 98%) der Verbindung (**21**) als farbloser Feststoff erhalten.

^1H -NMR: (500 MHz, DMSO-d_6); $\delta = 8.41 \text{ ppm}$ (d, $^3J_{6\text{-NH},6\text{-H}} = 6.5 \text{ Hz}$, 1 H, 6-NH), 8.13 ppm (t, $^3J_{\text{Gly-NH},\alpha\text{-H}} = 6.0 \text{ Hz}$, 1 H, Gly-NH), 7.89 ppm (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.8 \text{ Hz}$, 2 H, Fmoc ar.), 7.75-7.70 ppm (m, 2 H, Fmoc ar.), 7.63 ppm (d, $^3J_{\text{Ala-NH},\text{Ala}\alpha\text{-H}} = 7.2 \text{ Hz}$, 1 H, Ala-NH), 7.42 ppm (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5 \text{ Hz}$, 2 H, Fmoc ar.), 7.33 ppm (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5 \text{ Hz}$, 2 H, Fmoc ar.), 5.23 ppm (d, $^3J_{8\text{a-H},8\text{-H}} = 1.9 \text{ Hz}$, 1 H, 8a-H), 5.06 ppm (dd, $^3J_{3\text{-H},2\text{-H}^{\text{proR}}} = 6.6 \text{ Hz}$, $^3J_{3\text{-H},2\text{-H}^{\text{proS}}} = 1.4 \text{ Hz}$, 1 H, 3-H), 4.52 ppm (dd, $^3J_{8\text{-H},7\text{-H}} = 6.9 \text{ Hz}$, $^3J_{8\text{-H},8\text{a-H}} = 1.8 \text{ Hz}$, 1 H, 8-H), 4.46 ppm (dd, $^3J_{7\text{-H},8\text{-H}} = 7.0 \text{ Hz}$, $^3J_{7\text{-H},6\text{-H}} = 1.9 \text{ Hz}$, 1 H, 7-H), 4.30-4.26 ppm (m, 2 H, Fmoc-CH $_2$), 4.24-4.19 ppm (m, 2 H, Fmoc-CH/6-H), 4.09 ppm (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3 \text{ Hz}$, 1 H, Ala- α), 3.86 ppm (d, $^3J_{\alpha\text{-NH},\text{Gly-H}} = 5.9 \text{ Hz}$, 2 H, Gly- α), 3.60 ppm (s, 3 H, OMe), 3.14 ppm (dd, $^2J_{2\text{-H}^{\text{proR}},2\text{-H}^{\text{proS}}} = 11.1 \text{ Hz}$, $^3J_{2\text{-H}^{\text{proR}},3\text{-H}} = 6.7 \text{ Hz}$, 1 H, 2-H $^{\text{proR}}$), 3.09 ppm (dd, $^2J_{2\text{-H}^{\text{proS}},2\text{-H}^{\text{proR}}} = 11.1 \text{ Hz}$, $^3J_{2\text{-H}^{\text{proS}},3\text{-H}} = 1.5 \text{ Hz}$, 1 H, 2-H $^{\text{proS}}$), 1.27 ppm (s, 6 H, Isopr. -CH $_3$), 1.23 ppm (d, $^3J_{\text{Ala-CH}_3,\text{Ala-}\alpha} = 7.1 \text{ Hz}$, 3 H, Ala-CH $_3$).

^{13}C -NMR: (125 MHz, DMSO-d_6); δ = 173.1 ppm (Ala-CO), 169.8 ppm (Gly-CO₂Me), 169.5 ppm (3-CO), 165.5 ppm (5-CO), 155.7 ppm (Fmoc-CO), 143.8 ppm (Fmoc_{quart.}), 143.7 ppm (Fmoc_{quart.}), 140.7 ppm (Fmoc_{quart.}), 127.6 ppm (Fmoc_{ar.}), 127.0 ppm (Fmoc_{ar.}), 125.2 ppm (Fmoc_{ar.}), 120.1 ppm (Fmoc_{ar.}), 108.5 (Isopr._{quart.}), 76.3 ppm (8-C), 75.2 ppm (7-C), 65.6 ppm (Fmoc-CH₂), 63.2 ppm (3-C), 60.4 ppm (8a-C), 54.1 ppm (6-C), 51.6 ppm (OCH₃), 50.0 ppm (Ala- α -C), 46.6 ppm (Fmoc-CH), 40.9 ppm (Gly- α -C), 31.4 ppm (2-C), 26.2 ppm (Isopr.-CH₃), 24.0 ppm (Isopr.-CH₃), 18.0 ppm (Ala-CH₃).
HRMS (ESI): für C₃₂H₃₆N₄O₉S Na⁺ (M+Na⁺), ber.: 675.2095, gef.: 675.2094.

zyklo-[Btd-Gly]₂ (**22**)



C₂₀H₂₆N₆O₆S₂ [510.14]

Der lineare Vorläufer der Verbindung wurde mittels Festphasensynthese in 0.2 millimolarem Maßstab entsprechend dem **Festphasenprotokoll I** dargestellt. Die Abspaltung vom Harz erfolgte mit DCM/TFE/HOAc 7:2:1 über einen Zeitraum von 90 Minuten. Das Peptid wurde in Diethylether gefällt, abzentrifugiert und anschließend zwei Mal mit Ether gewaschen.

Das offenkettige Hexapeptid wurde in 160 mL DMF gelöst und auf 4 °C herabgekühlt, es wurden 41.0 mg (0.48 mmol, 3.0 eq) NaHCO₃ und 105 μL (0.48 mmol, 3.0 eq) DPPA zugegeben. Der Ansatz wurde für sechs Tage bei 4 °C und einen Tag bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 mL Wasser abgebrochen, anschließend wurde der Ansatz filtriert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in wenig MeOH/DCM 1:1 aufgenommen und in Diethylether gefällt, dieser Schritt wurde zwei Mal wiederholt. Der am Hochvakuum getrocknete Rückstand wurde flashchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 10:1), dabei wurden 25.0 mg (0.05 mmol, 31%) der Verbindung (**22**) als farbloser Feststoff erhalten.

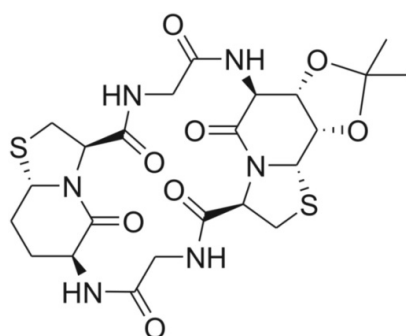
^1H -NMR: (500 MHz, DMSO-d_6); δ = 8.13 ppm (d, $^3J_{6\text{-NH},6\text{-H}}$ = 6.4 Hz, 1 H, 6-NH), 7.97 ppm (t, $^3J_{\text{Gly-NH},\alpha\text{-H}}$ = 5.2 Hz, 1 H, Gly-NH), 4.94 ppm (dd, $^3J_{3\text{-H},2\text{-H}^{\text{proR}}}$ = 7.7 Hz, $^3J_{3\text{-H},2\text{-H}^{\text{proS}}}$ = 5.8 Hz, 1 H, 3-H), 4.84 ppm (dd, $^3J_{8a\text{-H},8\text{-H}}$ = 10.9 Hz, $^3J_{8a\text{-H},8\text{-H}}$ = 4.1 Hz, 1 H, 8a-H), 4.02-3.97 ppm (m, 1 H, 6-H), 3.81 ppm (dd, $^2J_{\alpha\text{-H},\alpha\text{-H}}$ = 17.2 Hz, $^3J_{\alpha\text{-H},\text{Gly-NH}}$ = 5.3 Hz, 1 H, α -H), 3.72 ppm (dd, $^2J_{\alpha\text{-H},\alpha\text{-H}}$ = 17.2 Hz, $^3J_{\alpha\text{-H},\text{Gly-NH}}$ = 5.1 Hz, 1 H, α -H), 3.28 ppm (dd, $^2J_{2\text{-H}^{\text{proR}},2\text{-H}^{\text{proS}}}$ = 11.3 Hz, $^3J_{2\text{-H}^{\text{proR}},3\text{-H}}$ = 7.8 Hz, 1 H, 2-H^{proR}),

3.16 ppm (dd, $^2J_{2-H^{proS},2-H^{proR}} = 11.3$ Hz, $^3J_{2-H^{proS},3-H} = 5.8$ Hz, 1 H, 2-H^{proS}), 2.30-2.25 ppm (m, 1 H, 8-H), 2.23-2.17 ppm (m, 1 H, 7-H), 1.91-1.82 ppm (m, 1 H, 7-H), 1.81-1.73 ppm (m, 1 H, 8-H).

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO_{d6}); δ = 169.6 ppm (3-CO), 168.2 ppm (Gly-CO) 167.2 ppm (5-CO), 62.3 ppm (8-C), 62.2 ppm (3-C), 50.4 ppm (6-C), 42.9 ppm (Gly- α), 30.7 ppm (2-C), 27.5 ppm (8-C), 26.5 ppm (7-C).

HRMS (ESI): für C₂₀H₂₆N₆O₆S₂Na⁺ (M+Na⁺), ber.: 533.1247, gef.: 533.1245.

zyklo-[Pli=Cat^P-Gly-Btd-Gly] (23)



C₂₃H₃₀N₆O₈S₂ [582.16]

Der lineare Vorläufer der Verbindung wurde mittels Festphasensynthese in 0.2 millimolarem Maßstab entsprechend dem **Festphasenprotokoll I** dargestellt. Die Abspaltung vom Harz erfolgte mit DCM/TFE/HOAc 7:2:1 über einen Zeitraum von 90 Minuten. Das Peptid wurde in Diethylether gefällt, abzentrifugiert und anschließend zwei Mal mit Ether gewaschen.

Das offenkettige Hexapeptid wurde in 170 mL DMF gelöst und auf 4 °C herabgekühlt, es wurden 42.0 mg (0.48 mmol, 3.0 eq) NaHCO₃ und 108 μ L (0.48 mmol, 3.0 eq) DPPA zugegeben. Der Ansatz wurde für sechs Tage bei 4 °C und sechs Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 mL Wasser abgebrochen, anschließend wurde der Ansatz filtriert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in wenig MeOH/DCM 1:1 aufgenommen und in Diethylether gefällt, dieser Schritt wurde zwei Mal wiederholt. Der am Hochvakuum getrocknete Rückstand wurde zwei Mal flashchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 10:1; R_f = 0.26), dabei wurden 29.0 mg (0.05 mmol, 29%) der Verbindung **(23)** als farbloser Feststoff erhalten.

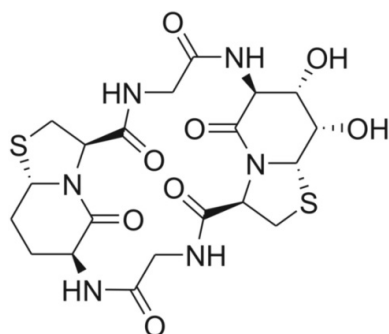
¹H-NMR: (600 MHz, DMSO_{d6}); δ = 9.22 ppm (d, $^3J_{6Btd-NH,6Btd-H} = 7.1$ Hz, 1 H, 6Btd-NH), 8.48 ppm (d, $^3J_{6-NH,6-H} = 2.2$ Hz, 1 H, 6-NH), 7.74 ppm (dd, $^3J_{Gly'-NH,\alpha'-H} = 8.8$ Hz, $^3J_{Gly'-NH,\alpha'-H} = 1.9$ Hz 1 H, Gly'-NH), 6.99 ppm (dd, $^3J_{Gly-NH,\alpha-H} = 5.9$ Hz, $^3J_{Gly-NH,\alpha-H} = 2.4$ Hz 1 H, Gly-NH), 5.33 ppm (dd, $^3J_{3Btd-H,2Btd-H^{proR}} = 7.9$ Hz, $^3J_{3Btd-H,2Btd-H^{proS}} = 3.0$ Hz, 1 H, 3Btd-H), 5.21 ppm (d, $^3J_{8a-H,8-H} = 2.0$ Hz, 1 H, 8a-H), 5.13 ppm (d, $^3J_{3-H,2-H^{proR}} = 6.6$ Hz, 1 H, 3-H), 4.77 ppm (dd, $^3J_{8aBtd-H,8Btd-H} = 10.7$ Hz, $^3J_{8aBtd-H,8Btd-H} = 3.4$ Hz, 1 H, 8aBtd-H), 4.60 ppm (dd, $^3J_{7-H,8-H} = 6.9$ Hz, $^3J_{7-H,6-H} = 2.4$ Hz, 1 H, 7-H), 4.51 ppm (dd, $^3J_{8-H,7-H} = 7.0$ Hz, $^3J_{8-H,8a-H} = 2.2$ Hz, 1 H, 8-H), 4.36 ppm (dd, $^2J_{\alpha'-H,\alpha'-H} = 16.9$ Hz, $^3J_{\alpha'-H,Gly'-NH} = 8.6$ Hz, 1 H, α' -H), 4.01 ppm

(dd, $^2J_{\alpha-H, \alpha'-H} = 18.0$ Hz, $^3J_{\alpha-H, Gly-NH} = 6.0$ Hz, 1 H, α -H), 3.93 ppm (dd, $^3J_{6-H, 6-NH} = 2.2$ Hz, $^3J_{6-H, 7-H} = 2.2$ Hz, 1 H, 6-H), 3.80-3.75 ppm (m, 1 H, 6Btd-H), 3.66-3.60 ppm (m, 2 H, α -H/ α' -H), 3.35 ppm (dd, $^2J_{2Btd-H}^{proS}, 2Btd-H}^{proR} = 10.8$ Hz, $^3J_{2Btd-H}^{proS}, 3Btd-H} = 3.1$ Hz, 1 H, 2Btd-H^{proS}), 3.19 ppm (dd, $^2J_{2Btd-H}^{proR}, 2Btd-H}^{proS} = 10.8$ Hz, $^3J_{2Btd-H}^{proR}, 3Btd-H} = 8.0$ Hz, 1 H, 2Btd-H^{proR}), 3.17 ppm (d, $^2J_{2-H}^{proS}, 2-H}^{proR} = 11.0$ Hz, 1 H, 2-H^{proS}), 3.07 ppm (dd, $^2J_{2-H}^{proR}, 2-H}^{proS} = 11.0$ Hz, $^3J_{2-H}^{proR}, 3-H} = 6.7$ Hz, 1 H, 2-H^{proR}), 2.26-2.20 ppm (m, 1 H, 8Btd-H), 2.02-1.93 ppm (m, 2 H, 7Btd-H), 1.75-1.66 ppm (m, 1 H, 8Btd-H), 1.28 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃), 1.26 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃).

¹³C-NMR: (150 MHz, DMSO_{d6}); δ = 168.4 ppm (3Btd-CO), 168.3 ppm (Gly'-CO), 168.2 ppm (3-CO), 168.1 ppm (Gly-CO), 166.7 ppm (5-CO), 166.5 ppm (5Btd-CO), 108.9 ppm (Isopr._{quart.}), 77.5 ppm (8-C), 74.5 ppm (7-C), 63.1 ppm (3-C), 61.5 ppm (3Btd-C), 60.5 ppm (8aBtd-C), 60.1 ppm (8a-C), 55.2 ppm (6-C), 50.3 ppm (6Btd-C), 42.0 ppm (Gly- α), 41.3 ppm (Gly'- α), 30.8 ppm (2-C), 29.6 ppm (2Btd-C), 28.5 ppm (8Btd-C), 26.4 ppm (7Btd-C), 26.0 ppm (Isopr.-CH₃), 23.7 ppm (Isopr.-CH₃).

HRMS (ESI): für C₂₃H₃₀N₆O₈S₂Na⁺ (M+Na⁺), ber.: 605.1459, gef.: 605.1456.

zyklo-[Pli=Cat-Gly-Btd-Gly] (24)



C₂₀H₂₆N₆O₈S₂ [542.13]

6.00 mg (0.01 mmol) der Verbindung (**23**) wurden in 1.00 mL TFA/Wasser 95:5 gelöst, nach einer Stunde bei Raumtemperatur wurde das Zyklopeptid in Diethylether ausgefällt. Das Peptid wurde abzentrifugiert und noch drei Mal mit Diethylether und einmal mit Pentan gewaschen. Anschließend wurde der farblose Niederschlag am Hochvakuum getrocknet. Es wurden 5 mg (0.01 mmol, 99%) des gewünschten Produkts erhalten.

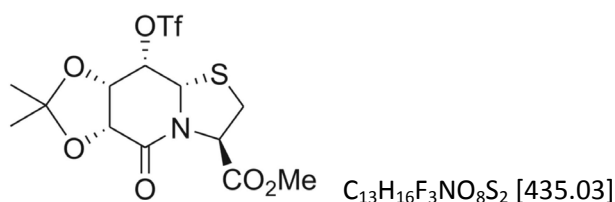
¹H-NMR: (600 MHz, DMSO_{d6}); δ = 9.13 ppm (d, $^3J_{6-NH, 6-H} = 6.8$ Hz, 1 H, 6-NH), 8.83 ppm (d, $^3J_{6Btd-NH, 6Btd-H} = 6.9$ Hz, 1 H, 6Btd-NH), 7.52 ppm (t, $^3J_{Gly-NH, \alpha-H} = 3.9$ Hz, 1 H, Gly-NH), 7.48 ppm (t, $^3J_{Gly-NH, \alpha-H} = 4.1$ Hz, 1 H, Gly-NH), 5.51 ppm (bs, 1 H, 7/8-OH), 5.32 ppm (bs, 1 H, 7/8-OH), 5.10-5.06 ppm (m, 2 H, 3-H/3Btd-H), 4.97 ppm (d, $^3J_{8a-H, 8-H} = 1.6$ Hz, 1 H, 8a-H), 4.85 ppm (dd, $^3J_{8aBtd-H, 8Btd-H} = 10.8$ Hz, $^3J_{8aBtd-H, 8Btd-H} = 3.7$ Hz, 1 H, 8aBtd-H), 3.95 ppm (dd, $^3J_{7-H, 6-H} = 8.6$ Hz, $^3J_{7-H, 8-H} = 2.4$ Hz, 1 H, 7-H), 3.91-3.72 ppm (m, 6 H, α -H/ α' -H/6Btd-H/8-H), 3.40 ppm (dd, $^3J_{6-H, 7-H} = 8.7$ Hz, $^3J_{6-H, 6-NH} = 6.7$ Hz, 1 H, 6-H), 3.25 ppm (dd, $^2J_{2-H, 2-H} = 11.4$ Hz, $^3J_{2-H, 3-H} = 4.8$ Hz, 1 H, 2-H), 3.22 ppm (dd, $^2J_{2-H, 2-H} = 11.1$ Hz, $^3J_{2-H, 3-H} = 7.1$ Hz, 1 H, 2-H), 3.19 ppm (dd, $^2J_{2-H, 2-H} = 10.8$ Hz,

$^3J_{2-H,3-H} = 2.6$ Hz, 1 H, 2-H), 3.00 ppm (dd, $^2J_{2-H,2-H} = 10.8$ Hz, $^3J_{2-H,3-H} = 2.6$ Hz, 1 H, 2-H), 2.26-2.20 ppm (m, 1 H, 8Btd-H), 2.03-1.96 ppm (m, 2 H, 7Btd-H), 1.80-1.67 ppm (m, 1 H, 8Btd-H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$); $\delta = 168.8$ ppm (3-CO/3Btd-CO), 168.6 ppm (3-CO/3Btd-CO), 168.0 ppm (Gly-CO/5-CO/5Btd-CO), 167.8 ppm (Gly-CO/5-CO/5Btd-CO), 167.4 ppm (Gly-CO/5-CO/5Btd-CO), 167.3 ppm (Gly-CO/5-CO/5Btd-CO), 70.1 ppm (7-C), 69.8 ppm (8-C), 63.5 ppm (8a-C), 63.0 ppm (3-C/3Btd-C), 62.8 ppm (3-C/3Btd-C), 61.4 ppm (8aBtd-C), 56.0 ppm (6-C), 50.2 ppm (6Btd-C), 42.9 ppm (Gly- α), 42.8 ppm (Gly- α), 30.4 ppm (2-C/2Btd-C), 30.2 ppm (2-C/2Btd-C), 28.9 ppm (8Btd-C), 26.5 ppm (7Btd-C).

HRMS (ESI): für $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}_8\text{S}_2\text{Na}^+$ ($\text{M}+\text{Na}^+$), ber.: 565.1146, gef.: 565.1146.

8a(S)H-(6R,7R)-O-isopropyliden-5oxo-(8R)-trifluormethansulfonyloxy-hexahydro-thiazolo[3,2-a]pyridin-3(R)-carbonsäure-methylester (25)



1.00 g (3.30 mmol, 1.0 eq) der Verbindung **(2)** wurden in 10.0 ml DCM_{abs} gelöst, mit 5.00 mL trockenem Pyridin versetzt und im Eisbad auf 0 °C abgekühlt. Anschließend wurden langsam 1.65 mL (9.90 mmol, 3.0 eq) Trifluormethansulfonsäureanhydrid in 5.00 mL DCM_{abs} zugetropft. Zunächst wurde eine Stunde bei 0 °C gerührt, daraufhin weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur. Durch Zugabe von 10 g Eis wurde die Reaktion abgebrochen. Die wässrige Phase wurde zwei Mal mit jeweils 50.0 mL Dichlormethan extrahiert und die organische Phase gegen jeweils 50.0 mL Salzsäure ($c = 0.5$ mol/L), gesättigte NaHCO_3 -Lösung sowie gesättigte NaCl -Lösung ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet. Abschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 1.27 g (2.92 mmol, 88%) der Verbindung **(25)** als schwachbrauner Feststoff erhalten.

Schmp.: 185.0 °C.

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3); $\delta = 5.69$ ppm (dd, $^3J_{3-H,2-H^{\text{proR}}} = 6.1$ Hz, $^3J_{3-H,2-H^{\text{proS}}} = 1.5$ Hz, 1 H, 3-H), 5.25 ppm (dd, $^3J_{8-H,7-H} = 4.4$ Hz, $^3J_{8-H,8a-H} = 1.1$ Hz, 1 H, 8-H), 5.06 ppm (d, $^3J_{8a-H,8-H} = 1.0$ Hz, 1 H, 8a-H), 4.79 ppm (d, $^3J_{6-H,7-H} = 9.0$ Hz, 1 H, 6-H), 4.68 ppm (dd, $^3J_{7-H,6-H} = 9.0$ Hz, $^3J_{7-H,8-H} = 4.4$ Hz, 1 H, 7-H), 3.79 ppm (s, 3 H, CO_2CH_3), 3.27 ppm (dd, $^2J_{2-H^{\text{proS}},2-H^{\text{proR}}} = 11.3$ Hz, $^3J_{2-H^{\text{proS}},3-H} = 1.5$ Hz, 1 H, 2-H $^{\text{proS}}$), 3.21 ppm (dd, $^2J_{2-H^{\text{proR}},2-H^{\text{proS}}} = 11.3$ Hz, $^3J_{2-H^{\text{proR}},3-H} = 6.1$ Hz, 1 H, 2-H $^{\text{proR}}$), 1.60 ppm (s, 3 H, Isopr.- CH_3^t), 1.46 ppm (s, 3 H, Isopr.- CH_3^h).

^{13}C -NMR: (125 MHz, CDCl_3); δ = 169.3 ppm (CO_2CH_3), 164.8 ppm (5-CO), 112.9 ppm (Isopr._{quart.}), 80.4 ppm (8-C), 72.0 ppm (7-C), 71.7 ppm (6-C), 61.1 ppm (3-C), 59.8 ppm (8a-C), 53.3 ppm (CO_2CH_3), 31.4 ppm (2-C), 25.3 ppm (Isopr.- CH_3), 24.0 ppm (Isopr.- CH_3).

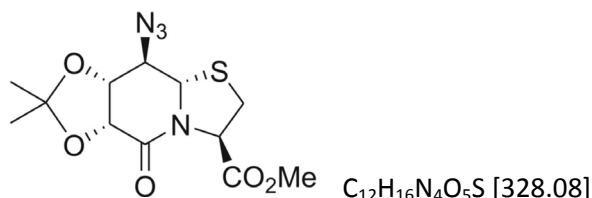
HRMS (ESI): für $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{NO}_8\text{S}_2 \text{Na}^+$ ($\text{M}+\text{Na}^+$), ber.: 458.0162, gef.: 458.0161.

CHN-Analyse: ber.: C: 35.86% H: 3.70% N: 13.09%
gef.: C: 35.26% H: 3.87% N: 2.64%.

IR (KBr): $\hat{\nu}$ = 3016 w, 1754 s, 1677 s, 1411 s, 1388 w, 1345 w, 1296 w, 1266 w, 1242 m, 1222 s, 1139 m, 1086 w, 929 m, 902 w, 611 w.

Drehwert: $[\alpha]_{\text{D}}^{15.0} = -62.4$, $[\alpha]_{578}^{15.0} = -66.7$, $[\alpha]_{546}^{15.0} = -72.9$, $[\alpha]_{436}^{15.0} = -121.6$, ($c = 0.990 \text{ g}/100 \text{ mL}$).

8a(S)H-(8S)-azido-(6R,7R)-O-isopropyliden-5oxo-hexahydro-thiazolo[3,2-a]pyridin-3(R)-carbonsäure-methylester (26)



1.26 g (2.90 mmol, 1.0 eq) der Verbindung **(25)** wurden in 50.0 mL DMF gelöst und auf 0 °C herabgekühlt. Nach der Zugabe von 0.95 g (14.5 mmol, 5.0 eq) Natriumazid wurde für weitere 36 Stunden bei 0 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand mit 50.0 mL Wasser aufgenommen. Es wurde drei Mal mit je 30.0 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde flashchromatographisch (DCM/EE 2:1; $R_f = 0.86$) gereinigt. Es konnten 700 mg (2.13 mmol, 73%) der Verbindung **(26)** als farbloser Feststoff erhalten werden.

Schmp.: 103.0 °C.

^1H -NMR: (500 MHz, CDCl_3); δ = 5.51 ppm (dd, $^3J_{3\text{-H},2\text{-H}} = 5.7 \text{ Hz}$, $^3J_{3\text{-H},2\text{-H}} = 4.1 \text{ Hz}$, 1 H, 3-H), 4.75 ppm (d, $^3J_{6\text{-H},7\text{-H}} = 7.6 \text{ Hz}$, 1 H, 6-H), 4.63 ppm (d, $^3J_{8\text{a-H},8\text{-H}} = 10.1 \text{ Hz}$, 1 H, 8a-H), 4.40 ppm (dd, $^3J_{7\text{-H},8\text{-H}} = 8.7 \text{ Hz}$, $^3J_{7\text{-H},6\text{-H}} = 7.6 \text{ Hz}$, 1 H, 7-H), 3.77 ppm (s, 3 H, CO_2CH_3), 3.48 ppm (dd, $^3J_{8\text{-H},8\text{a-H}} = 10.1 \text{ Hz}$, $^3J_{8\text{-H},7\text{-H}} = 8.6 \text{ Hz}$, 1 H, 8-H), 3.24 ppm (m, 2 H, 2-H), 1.56 ppm (s, 3 H, Isopr.- CH_3^{t}), 1.43 ppm (s, 3 H, Isopr.- CH_3^{h}).

^{13}C -NMR: (125 MHz, CDCl_3); δ = 169.3 ppm (CO_2CH_3), 164.4 ppm (5-CO), 112.1 ppm (Isopr._{quart.}), 76.9 ppm (7-C), 73.7 ppm (6-C), 67.1 ppm (8-C), 61.8 ppm (8a/3-C), 53.3 ppm (CO_2CH_3), 30.8 ppm (2-C), 27.3 ppm (Isopr.- CH_3), 25.1 ppm (Isopr.- CH_3).

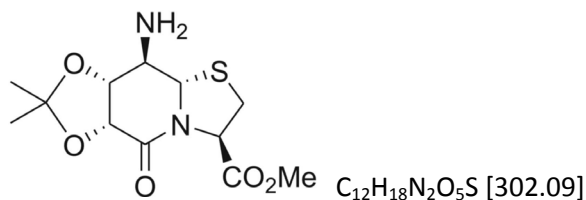
HRMS (ESI): für $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_5\text{S Na}^+$ ($\text{M}+\text{Na}^+$), ber.: 351.0734, gef.: 351.0734.

CHN-Analyse: ber.: C: 43.90% H: 4.91% N: 17.06%
gef.: C: 43.52% H: 4.98% N: 16.40%.

IR (KBr): $\hat{\nu}$ = 3005 w, 2980 w, 2118 s, 1736 s, 1665 s, 1430 m, 1385 m, 1310 w, 1275 m, 1206 w, 1159 w, 1098 w, 1075 m, 1022 w, 1007 w.

Drehwert: $[\alpha]_{\text{D}}^{19.0} = -158.9$, $[\alpha]_{578}^{19.0} = -166.4$, $[\alpha]_{546}^{19.0} = -190.4$, $[\alpha]_{436}^{19.0} = -338.3$, $[\alpha]_{365}^{19.0} = -549.8$,
(c = 1.025 g/100 mL, MeOH).

8a(S)H-(8S)-amino-(6R,7R)-O-isopropyliden-5oxo-hexahydro-thiazolo[3,2-a]pyridin-3(R)-carbonsäure-methylester (27)



100 mg (0.30 mmol) der Verbindung **(26)** wurden in 5.00 mL Methanol gelöst und mit 15.0 mg Palladium auf Aktivkohle (10%ig) versetzt. Der Ansatz wurde für 60 Stunden unter einer Wasserstoffatmosphäre von 10 bar im Autoklaven gerührt. Zum Abtrennen des Katalysators wurde über Kieselgur filtriert, das Filtrat eingeeengt und am Hochvakuum getrocknet. Das erhaltene Produktgemisch wurde flashchromatographisch aufgereinigt (DCM/EE 2:1; R_f = 0.26), dabei wurden 57.0 mg (0.19 mmol, 63%) der Verbindung **(27)** als farbloser, kristalliner Feststoff erhalten.

Schmp.: 124.0 °C.

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, DMSO-d_6); δ = 5.16 ppm (dd, $^3J_{3\text{-H},2\text{-H}^{\text{proR}}} = 7.0$ Hz, $^3J_{3\text{-H},2\text{-H}^{\text{proS}}} = 4.7$ Hz, 1 H, 3-H), 4.71 ppm (d, $^3J_{6\text{-H},7\text{-H}} = 7.6$ Hz, 1 H, 6-H), 4.63 ppm (d, $^3J_{8\text{a-H},8\text{-H}} = 9.9$ Hz, 1 H, 8a-H), 4.21 ppm (dd, $^3J_{7\text{-H},8\text{-H}} = 8.4$ Hz, $^3J_{7\text{-H},6\text{-H}} = 7.6$ Hz, 1 H, 7-H), 3.68 ppm (s, 3 H, CO_2CH_3), 3.34 ppm (dd, $^2J_{2\text{-H}^{\text{proR}},2\text{-H}^{\text{proS}}} = 11.7$ Hz, $^3J_{2\text{-H}^{\text{proR}},3\text{-H}} = 7.0$ Hz, 1 H, 2-H^{proR}), 3.06 ppm (dd, $^2J_{2\text{-H}^{\text{proS}},2\text{-H}^{\text{proR}}} = 11.7$ Hz, $^3J_{2\text{-H}^{\text{proS}},3\text{-H}} = 4.7$ Hz, 1 H, 2-H^{proS}), 2.58 ppm (dd, $^3J_{8\text{-H},8\text{a-H}} = 9.7$ Hz, $^3J_{8\text{-H},7\text{-H}} = 8.5$ Hz, 1 H, 8-H), 1.36 ppm (s, 3 H, Isopr.- CH_3^{t}), 1.32 ppm (s, 3 H, Isopr.- CH_3^{h}).

$^{13}\text{C-NMR}$: (125 MHz, DMSO-d_6); δ = 169.7 ppm (CO_2CH_3), 165.1 ppm (5-CO), 109.7 ppm (Isopr.- quart.), 78.8 ppm (7-C), 73.4 ppm (6-C), 65.3 ppm (8a-C), 61.9 ppm (3-C), 58.0 ppm (8-C), 52.5 ppm (CO_2CH_3), 29.7 ppm (2-C), 26.9 ppm (Isopr.- CH_3), 25.0 ppm (Isopr.- CH_3).

HRMS (ESI): für $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ (M+), ber.: 303.1009, gef.: 303.1007.

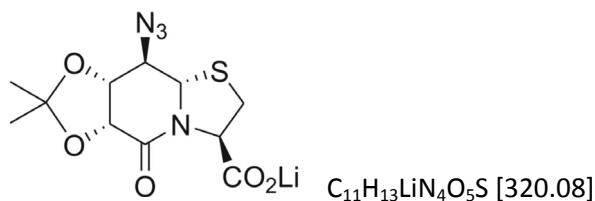
CHN-Analyse: ber.: C: 47.67% H: 6.00% N: 9.27%
gef.: C: 46.89% H: 6.32% N: 8.81%.

IR (KBr): $\hat{\nu}$ = 3309 w, 2979 w, 1743 s, 1657 s, 1429 m, 1380 w, 1352 m, 1287 w, 1262 w, 1238 w, 1203 m, 1175 m, 1111 w, 1083 w, 1060 w.

Drehwert: $[\alpha]_{\text{D}}^{18.0} = -151.7$, $[\alpha]_{578}^{18.0} = -158.6$, $[\alpha]_{546}^{18.0} = -180.9$, $[\alpha]_{436}^{18.0} = -314.1$,

($c = 1.043 \text{ g}/100 \text{ mL}$, MeOH).

8a(S)H-(8S)-azido-(6R,7R)-O-isopropyliden-5oxo-hexahydro-thiazolo[3,2-a]pyridin-3(R)-lithiumcarboxylat (28)



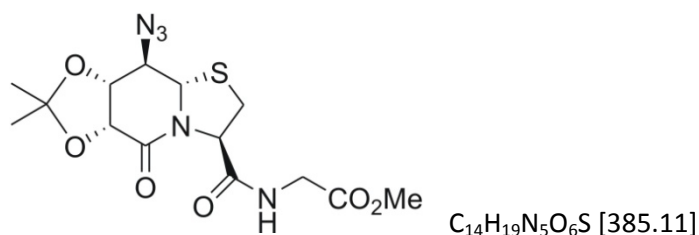
350 mg (1.07 mmol, 1.0 eq) der Verbindung **(26)** wurde in 2.10 mL MeOH gelöst, anschließend wurden 2.10 mL (2.15 mmol, 2.0 eq) 1N LiOH zugegeben und bei Raumtemperatur gerührt. Mittels DC-Kontrolle (DCM/EE 2:1) wurde der Reaktionsfortschritt kontrolliert. Nach vollständiger Hydrolyse des Esters wurde mit 1N HCl neutralisiert, das Lösungsmittel entfernt und der Ansatz am Hochvakuum getrocknet. Es konnten 342 mg (keine Berechnung der Ausbeute, da LiCl zusätzlich vorhanden war) der Verbindung **(28)** als schwachrosafarbenes Pulver erhalten werden.

$^1\text{H-NMR}$: (600 MHz, DMSO-d_6); $\delta = 4.92 \text{ ppm}$ (dd, $^3J_{3\text{-H},2\text{-H}^{\text{proR}}} = 6.8 \text{ Hz}$, $^3J_{3\text{-H},2\text{-H}^{\text{proS}}} = 2.0 \text{ Hz}$, 1 H, 3-H), 4.69 ppm (d, $^3J_{8\text{a-H},8\text{-H}} = 10.2 \text{ Hz}$, 1 H, 8a-H), 4.67 ppm (d, $^3J_{6\text{-H},7\text{-H}} = 7.5 \text{ Hz}$, 1 H, 6-H), 4.42 ppm (dd, $^3J_{7\text{-H},8\text{-H}} = 8.9 \text{ Hz}$, $^3J_{7\text{-H},6\text{-H}} = 7.4 \text{ Hz}$, 1 H, 7-H), 3.58 ppm (dd, $^3J_{8\text{-H},8\text{a-H}} = 10.2 \text{ Hz}$, $^3J_{8\text{-H},7\text{-H}} = 8.9 \text{ Hz}$, 1 H, 8-H), 3.19 ppm (dd, $^2J_{2\text{-H}^{\text{proS}},2\text{-H}^{\text{proR}}} = 10.3 \text{ Hz}$, $^3J_{2\text{-H}^{\text{proS}},3\text{-H}} = 2.0 \text{ Hz}$, 1 H, 2-H^{proS}), 3.12 ppm (dd, $^2J_{2\text{-H}^{\text{proR}},2\text{-H}^{\text{proS}}} = 10.2 \text{ Hz}$, $^3J_{2\text{-H}^{\text{proR}},3\text{-H}} = 6.9 \text{ Hz}$, 1 H, 2-H^{proR}), 1.43 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃^t), 1.33 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃^h).

$^{13}\text{C-NMR}$: (150 MHz, DMSO-d_6); $\delta = 170.1 \text{ ppm}$ (CO_2CH_3), 162.5 ppm (5-CO), 110.3 ppm (Isopr.-quart.), 76.1 ppm (7-C), 73.5 ppm (6-C), 66.6 ppm (8-C), 63.7 ppm (3-C), 60.4 ppm (8a-C), 31.1 ppm (2-C), 27.0 ppm (Isopr.-CH₃), 25.1 ppm (Isopr.-CH₃).

HRMS (ESI): für $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_5\text{SNa}^+$ ($\text{M}+\text{Na}^+$), ber.: 337.0577, gef.: 337.0576.

IR (KBr): $\hat{\nu} = 3427 \text{ s}$, 2991 w, 2124 s, 1634 s, 1445 m, 1406 m, 1256 m, 1212 m, 1159 w, 1082 m, 997 w, 930 w, 877 m, 825 w, 524 m.

(8S)-azido-Pli^{8P}=Cat-Gly-OMe (29)

364 mg (1.14 mmol, 1.0 eq) **(28)** wurden in 10.0 mL DMF gelöst, es wurden 432 mg (1.14 mmol, 1.0 eq) HBTU, 175 mg (1.14 mmol, 1.0 eq) HOBt und 143 mg (1.14 mmol, 1.0 eq) Glycinmethylester-HCl zugegeben. Der pH-Wert wurde durch DIPEA-Zugabe auf pH = 8 eingestellt und der Ansatz für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand mit 75.0 mL DCM aufgenommen und gegen jeweils 50.0 mL Salzsäure ($c = 0.5 \text{ mol/L}$), gesättigte NaHCO_3 -Lösung sowie gesättigte NaCl -Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde abschließend säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/EE 1:1; $R_f = 0.40$). Es wurden 295 mg (0.77 mmol, 67%) der Verbindung **(29)** in Form eines farblosen Pulvers erhalten.

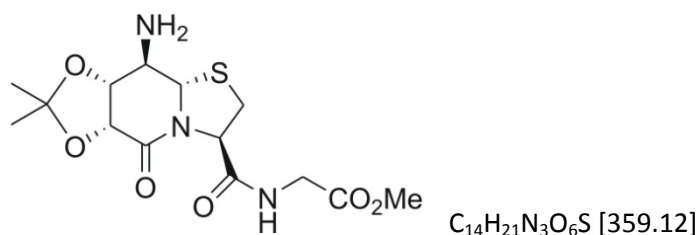
$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, DMSO-d_6); $\delta = 8.47 \text{ ppm}$ (t, $^3J_{\text{Gly-NH},\alpha\text{-H}} = 5.9 \text{ Hz}$, 1 H, Gly-NH), 5.18 ppm (dd, $^3J_{3\text{-H},2\text{-H}^{\text{proR}}} = 6.7 \text{ Hz}$, $^3J_{3\text{-H},2\text{-H}^{\text{proS}}} = 3.0 \text{ Hz}$, 1 H, 3-H), 4.77 ppm (d, $^3J_{6\text{-H},7\text{-H}} = 7.6 \text{ Hz}$, 1 H, 6-H), 4.71 (d, $^3J_{8\text{a-H},8\text{-H}} = 10.1 \text{ Hz}$, 1 H, 8a-H), 4.45 ppm (dd, $^3J_{7\text{-H},8\text{-H}} = 8.7 \text{ Hz}$, $^3J_{7\text{-H},6\text{-H}} = 7.6 \text{ Hz}$, 1 H, 7-H), 3.87 ppm (d, $^3J_{\alpha\text{-H},\text{Gly-NH}} = 5.9 \text{ Hz}$, 2 H, $\alpha\text{-H}$), 3.77 ppm (dd, $^3J_{8\text{-H},8\text{a-H}} = 10.1 \text{ Hz}$, $^3J_{8\text{-H},7\text{-H}} = 8.7 \text{ Hz}$, 1 H, 8-H), 3.63 ppm (s, 3 H, CO_2CH_3), 3.36 ppm (dd, $^2J_{2\text{-H}^{\text{proR}},2\text{-H}^{\text{proS}}} = 11.3 \text{ Hz}$, $^3J_{2\text{-H}^{\text{proR}},3\text{-H}} = 6.7 \text{ Hz}$, 1 H, 2-H^{proR}), 3.11 ppm (dd, $^2J_{2\text{-H}^{\text{proS}},2\text{-H}^{\text{proR}}} = 11.3 \text{ Hz}$, $^3J_{2\text{-H}^{\text{proS}},3\text{-H}} = 3.0 \text{ Hz}$, 1 H, 2-H^{proS}), 1.44 ppm (s, 3 H, Isopr.- CH_3^{t}), 1.35 ppm (s, 3 H, Isopr.- CH_3^{h}).

$^{13}\text{C-NMR}$: (125 MHz, DMSO-d_6); $\delta = 170.9 \text{ ppm}$ (CO_2CH_3), 169.1 ppm (3-CO), 164.8 ppm (5-CO), 110.8 ppm (Isopr.- quart.), 76.4 ppm (7-C), 73.5 ppm (6-C), 65.8 ppm (8-C), 62.9 ppm (3-C), 61.8 ppm (8a-C), 51.9 ppm (CO_2CH_3), 40.9 ppm ($\alpha\text{-C}$), 30.6 ppm (2-C), 27.0 ppm (Isopr.- CH_3), 25.4 ppm (Isopr.- CH_3).

HRMS (ESI): für $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_6\text{SNa}^+$ ($\text{M}+\text{Na}^+$), ber.: 408.0948, gef.: 408.0942.

IR (KBr): $\hat{\nu} = 3341 \text{ s}$, 2991 w, 2956 w, 2119 s, 1755 s, 1670 s, 1539 m, 1414 w, 1377 m, 1261 m, 1211 m, 1161 w, 1075 m, 1032 w, 878 m.

Drehwert: $[\alpha]_{\text{D}}^{18.5} = -164.7$, $[\alpha]_{578}^{18.5} = -172.9$, $[\alpha]_{546}^{18.5} = -199.3$, $[\alpha]_{436}^{18.5} = -398.0$, $[\alpha]_{365}^{18.5} = -674.9$, ($c = 0.662 \text{ g/100 mL}$, MeOH).

(8S)-amino-Pli^{BP}=Cat-Gly-OMe (30)

460 mg (1.19 mmol) der Verbindung **(29)** wurden in 2.00 mL Methanol gelöst und mit 15.0 mg Palladium auf Aktivkohle (10%ig) versetzt. Der Ansatz wurde für 48 Stunden unter einer Wasserstoffatmosphäre von 10 bar im Autoklaven gerührt. Zum Abtrennen des Katalysators wurde über Kieselgur filtriert, das Filtrat eingeeengt und am Hochvakuum getrocknet. Das erhaltene Produktgemisch wurde flashchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 10:1; $R_f = 0.26$), dabei wurden 154 mg (0.43 mmol, 36%) der Verbindung **(30)** als farbloser Feststoff erhalten.

Schmp.: 177.0 °C.

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6); δ = 8.45 ppm (t, $^3J_{\text{Gly-NH}, \beta\text{-H}} = 5.9$ Hz, 1 H, Gly-NH), 5.01 ppm (dd, $^3J_{3\text{-H}, 2\text{-H}^{\text{proR}}} = 6.9$ Hz, $^3J_{3\text{-H}, 2\text{-H}^{\text{proS}}} = 4.0$ Hz, 1 H, 3-H), 4.84 ppm (d, $^3J_{6\text{-H}, 7\text{-H}} = 7.6$ Hz, 1 H, 6-H), 4.61 ppm (d, $^3J_{8a\text{-H}, 8\text{-H}} = 9.8$ Hz, 1 H, 8a-H), 4.17 ppm (dd, $^3J_{7\text{-H}, 8\text{-H}} = 8.6$ Hz, $^3J_{7\text{-H}, 6\text{-H}} = 7.6$ Hz, 1 H, 7-H), 3.71 ppm (d, $\alpha\text{-H, Gly-NH} = 5.9$ Hz, 2 H, $\alpha\text{-H}$), 3.63 ppm (s, 3 H, CO_2CH_3), 3.22 ppm (dd, $^2J_{2\text{-H}^{\text{proR}}, 2\text{-H}^{\text{proS}}} = 11.5$ Hz, $^3J_{2\text{-H}^{\text{proR}}, 3\text{-H}} = 6.9$ Hz, 1 H, 2-H^{proR}), 3.02 ppm (dd, $^2J_{2\text{-H}^{\text{proS}}, 2\text{-H}^{\text{proR}}} = 11.5$ Hz, $^3J_{2\text{-H}^{\text{proS}}, 3\text{-H}} = 4.0$ Hz, 1 H, 2-H^{proS}), 2.56 ppm (dd, $^3J_{8\text{-H}, 8a\text{-H}} = 9.8$ Hz, $J_{8\text{-H}, 7\text{-H}} = 8.6$ Hz, 1 H, 8-H), 1.37 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃^t), 1.32 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃^h).

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6); δ = 170.1 ppm (CO_2CH_3), 169.5 ppm (3-CO), 165.6 ppm (5-CO), 109.8 ppm (Isopr.-quart.), 78.7 ppm (7-C), 73.8 ppm (6-C), 65.9 ppm (8a-C), 63.1 ppm (3-C), 58.3 ppm (8-C), 51.9 (CO_2CH_3), 40.9 ppm ($\alpha\text{-C}$), 30.3 ppm (2-C), 27.2 ppm (Isopr.-CH₃), 25.3 ppm (Isopr.-CH₃).

HRMS (ESI): für $C_{14}H_{22}N_3O_6S$ ($M+H^+$), ber.: 360.1224, gef.: 360.1225.

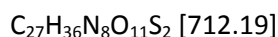
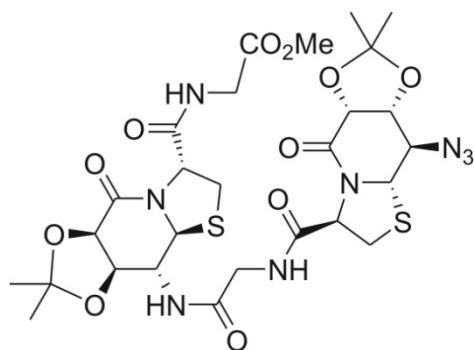
CHN-Analyse: ber.: C: 46.79% H: 5.89% N: 11.69%.

gef.: C: 46.35% H: 6.01% N: 11.68%.

IR (KBr): $\hat{\nu}$ = 3388 w, 3254 m, 3068 m, 2981 w, 2928 m, 1749 m, 1661 s, 1555 m, 1434 m, 1373 m, 1253 s, 1213 m, 1130 w, 1093 w, 1072 w, 1035 w, 1007 w, 986 w, 943 w, 883 w, 829 w, 687 w, 619 w, 507 w, 463 w.

Drehwert: $[\alpha]_D^{19.0} = -162.5$, $[\alpha]_{578}^{19.0} = -169.9$, $[\alpha]_{546}^{19.0} = -194.2$, $[\alpha]_{436}^{19.0} = -341.1$, $[\alpha]_{365}^{19.0} = -546.0$,

($c = 0.976$ g/100 mL, MeOH).

(8S)-azido-Pli^{8P}=Cat-Gly-Pli^{8P}=Cat-Gly-OMe (31)

166 mg (0.43 mmol, 1.0 eq) der Verbindung **(29)** wurden in 5.00 mL 1,4-Dioxan gelöst, anschließend wurden 0.85 mL (0.85 mmol, 2.0 eq) 1N LiOH zugegeben und bei Raumtemperatur gerührt. Mittels DC-Kontrolle (DCM/EE 2:1) wurde der Reaktionsfortschritt kontrolliert. Nach vollständiger Hydrolyse des Esters wurde mit 1N HCl neutralisiert, das Lösungsmittel entfernt und der Ansatz am Hochvakuum getrocknet.

Der Rückstand wurde in 5.00 mL DMF aufgenommen, es folgte die Zugabe von 153 mg (0.43 mmol, 1.0 eq) der Verbindung **(30)**, 163 mg (0.43 mmol, 1.0 eq) HBTU sowie 66.0 mg (0.43 mmol, 1.0 eq) HOBT. Der pH-Wert der Lösung wurde mit DIPEA auf pH = 8 eingestellt und der Ansatz bei Raumtemperatur für zehn Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand mit etwa 10 mL Methanol aufgenommen und im Ultraschallbad behandelt. Dieses wurde zwei Mal wiederholt, anschließend wurde mit Diethylether gewaschen. Es wurden 270 mg (0.38 mmol, 88%) eines blass gelben Feststoffs erhalten.

Schmp.: 236.5 °C.

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO_{d6}); δ = 8.51 ppm (t, $^3J_{\text{Gly-NH},\alpha\text{-H}}$ = 5.8 Hz, 1 H, Gly-NH), 8.40 ppm (t, $^3J_{\text{Gly'-NH},\alpha\text{-H}}$ = 5.8 Hz, 1 H, Gly'-NH), 8.17 ppm (d, $^3J_{8\text{'-NH},8\text{'-H}}$ = 8.9 Hz, 1 H, 8'-NH), 5.12 ppm (dd, $^3J_{3\text{-H},2\text{-H}}^{\text{proR}}$ = 6.7 Hz, $^3J_{3\text{-H},2\text{-H}}^{\text{proS}}$ = 3.8 Hz, 1 H, 3-H), 5.11 ppm (dd, $^3J_{3\text{'-H},2\text{'-H}}^{\text{proR}}$ = 7.0 Hz, $^3J_{3\text{'-H},2\text{'-H}}^{\text{proS}}$ = 4.0 Hz, 1 H, 3'-H), 4.95 ppm (d, $^3J_{8\text{a'-H},8\text{'-H}}$ = 10.4 Hz, 1 H, 8a'-H), 4.76 ppm (d, $^3J_{6\text{-H},7\text{-H}}$ = 7.0 Hz, 1 H, 6-H), 4.76 ppm (d, $^3J_{8\text{a-H},8\text{-H}}$ = 10.7 Hz, 1 H, 8a-H), 4.46 ppm (dd, $^3J_{7\text{'-H},8\text{'-H}}$ = 8.7 Hz, $^3J_{7\text{'-H},6\text{'-H}}$ = 7.5 Hz, 1 H, 7'-H), 4.45 ppm (dd, $^3J_{7\text{-H},8\text{-H}}$ = 9.0 Hz, $^3J_{7\text{-H},6\text{-H}}$ = 7.2 Hz, 1 H, 7-H), 3.86 ppm (dd, $^3J_{\alpha\text{-H},\text{Gly'-NH}}$ = 5.7 Hz, $J_{16\text{-H}}$ = 2.7 Hz, 2 H, α' -CH₂), 3.78 ppm (m, 4 H, 8-H, 8'-H, α -CH₂), 3.63 ppm (s, 3 H, OMe), 3.38 ppm (dd, $^2J_{2\text{-H}}^{\text{proR}}, ^2J_{2\text{-H}}^{\text{proS}}$ = 11.5 Hz, $^3J_{2\text{-H}}^{\text{proR}}, ^3J_{3\text{-H}}$ = 6.7 Hz, 1 H, 2-H^{proR}), 3.23 ppm (dd, $^2J_{2\text{'-H}}^{\text{proR}}, ^2J_{2\text{'-H}}^{\text{proS}}$ = 11.6 Hz, $^3J_{2\text{'-H}}^{\text{proR}}, ^3J_{3\text{'-H}}$ = 7.0 Hz, 1 H, 2'-H^{proR}), 3.13 ppm (dd, $^2J_{2\text{-H}}^{\text{proS}}, ^2J_{2\text{-H}}^{\text{proR}}$ = 11.5 Hz, $^3J_{2\text{-H}}^{\text{proS}}, ^3J_{3\text{-H}}$ = 3.8 Hz, 1 H, 2-H^{proS}), 3.02 ppm (dd, $^2J_{2\text{'-H}}^{\text{proS}}, ^2J_{2\text{'-H}}^{\text{proR}}$ = 11.5 Hz, $^3J_{2\text{'-H}}^{\text{proS}}, ^3J_{3\text{'-H}}$ = 4.0 Hz, 1 H, 2'-H^{proS}), 1.44 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃), 1.37 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃), 1.36 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃), 1.29 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃).

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO_{d6}); δ = 177.1 ppm (Gly'-CO₂Me), 169.3 ppm (3'-C), 168.8 ppm (3-C, Gly-CO), 164.9 ppm (5-CO), 164.8 ppm (5'-CO), 110.8 ppm (Isopr._{quart.}), 110.2 ppm (Isopr._{quart.}).

76.5 ppm (7'-C), 75.7 ppm (7-C), 73.8 ppm (6-C), 73.6 ppm (6'-C), 65.7 ppm (8-C), 63.3 ppm (3-C), 63.2 ppm (3'-C), 62.6 ppm (8a'-C), 62.1 ppm (8a-C), 54.8 ppm (8'-C), 51.9 ppm (OCH₃), 42.0 ppm (α -C), 40.8 ppm (α' -C), 30.9 ppm (2-C), 30.6 ppm (2'-C), 27.2 ppm (Isopr.-CH₃), 27.0 ppm (Isopr.-CH₃), 25.5 ppm (Isopr.-CH₃), 25.2 ppm (Isopr.-CH₃).

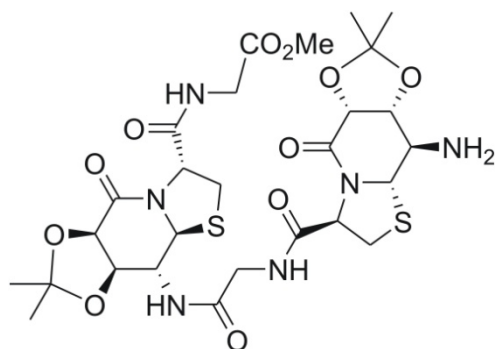
HRMS (ESI): für C₂₇H₃₆N₈O₁₁S₂Na⁺ (M+Na⁺), ber.: 735.1837, gef.: 735.1831.

CHN-Analyse: ber.: C: 45.50% H: 5.09% N: 15.72%.

gef.: C: 41.52% H: 5.58% N: 11.92%.

IR (KBr): $\hat{\nu}$ = 3340 w, 2963 m, 2122 m, 1747 m, 1668 m, 1557 m, 1418 m, 1262 s, 1098 s, 1020 s, 873 w, 801 s, 703 w, 485 w.

(8S)-amino-Pli^{8P}=Cat-Gly-Pli^{8P}=Cat-Gly-OMe (32)



C₂₇H₃₈N₆O₁₁S₂ [686.20]

300 mg (0.42 mmol) der Verbindung **(31)** wurden in 10 mL MeOH/DCM 1:1 gelöst und mit 50.0 mg Palladium auf Aktivkohle (10%ig) versetzt. Der Ansatz wurde für 30 Stunden unter einer Wasserstoffatmosphäre von 10 bar im Autoklaven gerührt. Zum Abtrennen des Katalysators wurde über Kieselgur filtriert, das Filtrat wurde eingedunstet und am Hochvakuum getrocknet. Das erhaltene Produktgemisch wurde flashchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 10:1; R_f = 0.14), dabei wurden 225 mg (0.33 mmol, 79%) der Verbindung **(32)** als farbloser Feststoff erhalten.

Schmp.: 228.0 °C.

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆); δ = 8.51 ppm (t, ³J_{Gly-NH, α -H} = 5.9 Hz, 1 H, Gly'-NH), 8.42 ppm (t, ³J_{Gly-NH, α -H} = 5.9 Hz, 1 H, Gly-NH), 8.10 ppm (d, ³J_{8'-NH,8'-H} = 9.0 Hz, 1 H, 8'-NH), 5.10 ppm (dd, ³J_{3-H,2-H}^{proR} = 6.8 Hz, ³J_{3-H,2-H}^{proS} = 4.3 Hz, 1 H, 3-H), 4.98 ppm (dd, ³J_{3'-H,2'-H}^{proR} = 6.7 Hz, ³J_{3'-H,2'-H}^{proS} = 5.6 Hz, 1 H, 3'-H), 4.94 ppm (d, ³J_{8a'-H,8'-H} = 10.3 Hz, 1 H, 8a'-H), 4.75 ppm (d, ³J_{6'-H,7'-H} = 7.0 Hz, 1 H, 6'-H) 4.68 ppm (d, ³J_{6-H,7-H} = 7.7 Hz, 1 H, 6-H), 4.66 ppm (d, ³J_{8a-H,8-H} = 9.6 Hz, 1 H, 8a-H), 4.42 ppm (dd, ³J_{7'-H,8'-H} = 9.1 Hz, ³J_{7'-H,6'-H} = 7.7 Hz, 1 H, 7'-H), 4.18 ppm (dd, ³J_{7-H,8-H} = 8.6 Hz, ³J_{7-H,6-H} = 7.7 Hz, 1 H, 7-H), 3.85 ppm (d, ³J _{α' -H,Gly'-NH} = 6.0 Hz, α' -CH₂), 3.78 ppm (dd, ³J_{8'-H,8a'-H} = 10.3 Hz, ³J_{8'-H,8'-NH} = 9.0 Hz, 1 H, 8'-H), 3.74 ppm (d, ³J _{α -H,Gly-NH} = 6.0 Hz, α -CH₂), 3.62 ppm (s, 3 H, OMe), 3.26 ppm (dd, ²J_{2'-H}^{proR},²J_{2'-H}^{proS} = 11.6 Hz, ³J_{2'-H}^{proR},³J_{2'-H}^{proS} = 6.9 Hz, 1 H, 2'-H^{proR}), 3.22 ppm (dd, ²J_{2-H}^{proR},²J_{2-H}^{proS} = 11.6 Hz, ³J_{2-H}^{proR},³J_{2-H}^{proS} = 6.9 Hz, 1 H, 2-H^{proR}) 3.03 ppm (dd, ²J_{2'-H}^{proS},²J_{2'-H}^{proR} = 11.6 Hz,

$^3J_{2'-H}^{proS},_{3'-H} = 5.6$ Hz, 1 H, $2'-H^{proS}$), 3.00 ppm (dd, $^2J_{2-H}^{proS},_{2-H}^{proR} = 11.6$ Hz, $^3J_{2-H}^{proS},_{3-H} = 4.3$ Hz, 1 H, $2-H^{proS}$), 2.57 ppm (dd, $^3J_{8-H,8a-H} = 9.6$ Hz, $^3J_{8-H,7-NH} = 8.7$ Hz, 1 H, 8-H), 1.96 ppm (bs, 2H, 8-NH₂), 1.37 ppm (s, 6 H, Isopr.-CH₃), 1.31 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃), 1.30 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃).

^{13}C -NMR: (125 MHz, DMSO-d₆); δ = 169.9 ppm (Gly'-CO₂Me), 169.1 ppm (3'-CO), 169.0 ppm (3-CO), 168.4 ppm (Gly-CO), 165.6 ppm (5-CO), 164.7 ppm (5'-CO), 110.0 ppm (Isopr.-quart.), 109.6 ppm (Isopr.-quart.), 78.6 ppm (7-C), 75.5 ppm (7'-C), 73.8 ppm (6-C), 73.6 ppm (6'-C), 66.1 ppm (8a-C), 63.6 ppm (3-C), 63.1 ppm (3'-C), 62.4 ppm (8a'-C), 58.0 ppm (8-C), 54.6 ppm (8'-C), 51.7 ppm (OCH₃), 41.9 ppm (α -C), 40.6 ppm (α' -C), 30.5 ppm (2-C), 30.4 ppm (2'-C), 27.1 ppm (Isopr.-CH₃), 27.0 ppm (Isopr.-CH₃), 25.3 ppm (Isopr.-CH₃), 25.0 ppm (Isopr.-CH₃).

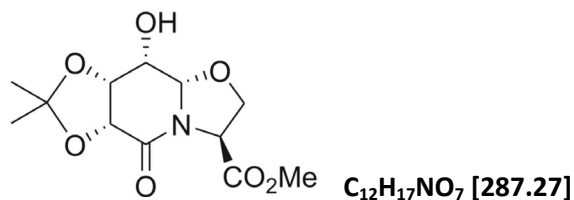
HRMS (ESI): für C₂₇H₃₉N₆O₁₁S₂⁺ (M+H⁺), ber.: 687.2113, gef.: 687.2117.

CHN-Analyse: ber.: C: 47.22% H: 5.58% N: 12.24%.
gef.: C: 45.72% H: 5.79% N: 11.88%.

IR: $\hat{\nu}$ = 3292 w, 2988 m, 2938 m, 2122 m, 1741 m, 1653 a, 1532 m, 1415 m, 1375 m, 1248 m, 1207 s, 1076 s, 874 w, 558 w.

Drehwert: $[\alpha]_D^{16.0} = -125.0$, $[\alpha]_{578}^{16.0} = -130.5$, $[\alpha]_{546}^{16.0} = -149.4$, $[\alpha]_{436}^{16.0} = -262.4$, $[\alpha]_{365}^{16.0} = -422.4$,
(c = 0.526 g/100 mL, MeOH/CHCl₃ 1:1).

8a(S)H-(8R)-hydroxy-(6R,7R)-O-isopropyliden-5oxo-hexahydro-oxazolo[3,2-a]pyridin-3(R)-carbonsäure-methylester (33)



4.70 g (25.0 mmol, 1.0 eq) der Verbindung **(1)** wurden in 50 mL Acetonitril gelöst und mit 9.1 g (32.5 mmol, 1.3 eq) IBX versetzt. Der Ansatz wurde für zwei Stunden unter Rückfluss erhitzt, anschließend wurde für eine Stunde im Eisbad gekühlt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und mit 20 mL Acetonitril nachgewaschen. Das Filtrat wurde unter vermindertem Druck eingeeengt und der Rückstand am Hochvakuum getrocknet. Das erhaltene Öl wurde in 22 mL MeOH/Pyridin (10:1) gelöst, es erfolgte die Zugabe von 5.00 g L-Serinmethylester-HCl (32.2 mmol, 1.3 eq). Der Ansatz wurde für drei Tage gerührt, im Anschluss daran wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in 50 mL Essigsäureethylester sowie 10 mL Wasser aufgenommen. Die wässrige Phase wurde so oft mit Essigsäureethylester extrahiert, bis dass kein Produkt mehr mittels DC nachweisbar war. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit HCl (c = 1 mol/L) gewaschen und auch diese wässrige Phase wurde mehrfach reextrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet

und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde abschließend säulenchromatographisch aufgereinigt (EE 2:1; $R_f = 0.34$). Es wurden 1.36 g (4.74 mmol, 19%) der Verbindung **(33)** in Form eines farblosen Pulvers erhalten.

Schmp.: 142.0 °C.

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, DMSO-d_6); $\delta = 5.14$ ppm (d, $^3J_{8\text{-OH},8\text{-H}} = 3.5$ Hz, 1 H, 8-OH), 5.03 ppm (d, $^3J_{8\text{a-H},8\text{-H}} = 2.1$ Hz, 1 H, 8a-H), 4.73 ppm (dd, $^3J_{3\text{-H},2\text{-H}^{\text{proR}}} = 7.4$ Hz, $^3J_{3\text{-H},2\text{-H}^{\text{proS}}} = 5.0$ Hz, 1 H, 3-H), 4.59 ppm (d, $^3J_{6\text{-H},7\text{-H}} = 8.6$ Hz, 1 H, 6-H), 4.49 ppm (dd, $^3J_{7\text{-H},6\text{-H}} = 8.6$ Hz, $^3J_{7\text{-H},8\text{-H}} = 3.1$ Hz, 1 H, 7-H), 4.31 ppm (dd, $^2J_{2\text{-H}^{\text{proR}},2\text{-H}^{\text{proS}}} = 8.4$ Hz, $^3J_{2\text{-H}^{\text{proR}},3\text{-H}} = 7.3$ Hz, 1 H, 2-H^{proR}), 4.09 ppm (dt, $^3J_{8\text{-H},8\text{-OH}} = 3.4$ Hz, $^3J_{8\text{-H},8\text{a-H}} = 2.1$ Hz, 1 H, 8-H), 3.97 ppm (dd, $^2J_{2\text{-H}^{\text{proS}},2\text{-H}^{\text{proR}}} = 8.4$ Hz, $^3J_{2\text{-H}^{\text{proS}},3\text{-H}} = 5.2$ Hz, 1 H, 2-H^{proS}), 3.68 ppm (s, 3 H, CO_2CH_3), 1.39 ppm (s, 3 H, Isopr.- CH_3^{t}), 1.31 ppm (s, 3 H, Isopr.- CH_3^{h}).

$^{13}\text{C-NMR}$: (125 MHz, DMSO-d_6); $\delta = 169.8$ ppm (CO_2CH_3), 166.3 ppm (5-CO), 110.1 ppm (Isopr.-quart.), 87.9 ppm (8a-C), 73.0 ppm (7-C), 71.6 ppm (6-C), 68.4 ppm (2-C), 64.9 ppm (8-C), 55.8 ppm (3-C), 52.4 ppm (CO_2CH_3), 25.7 ppm (Isopr.- CH_3), 24.7 ppm (Isopr.- CH_3).

HRMS (ESI): für $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{NO}_6\text{Na}^+$ ($\text{M}+\text{Na}^+$), ber.: 310.0897, gef.: 310.0899.

CHN-Analyse: ber.: C: 50.17% H: 5.96% N: 4.88%

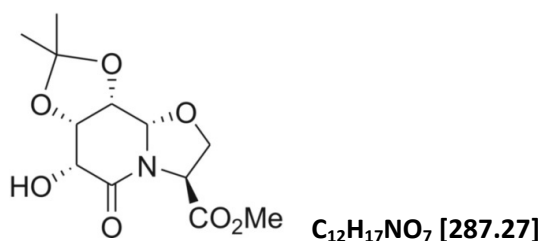
gef.: C: 50.09% H: 6.05% N: 4.78%.

IR: $\tilde{\nu} = 3389$ w, 2982 w, 2962 w, 2915 w, 1737 s, 1650 s, 1440 m, 1369 w, 1260 m, 1202 m, 1081 m, 954 m, 877 w, 837 m, 672 w.

Drehwert: $[\alpha]_{\text{D}}^{22.0} = -44.6$, $[\alpha]_{578}^{22.0} = -46.5$, $[\alpha]_{546}^{22.0} = -53.1$, $[\alpha]_{436}^{22.0} = -93.0$,

($c = 1.051$ g/100 mL, CHCl_3).

8a(S)H-(7S,8R)-O-isopropyliden-(6R)-hydroxy-5oxo-hexahydro-oxazolo[3,2-a]pyridin-3(R)-carbonsäure-methylester (34)



1.36 g (4.74 mmol, 1.0 eq) der Verbindung **(33)** wurden in 20.0 mL Dichlormethan gelöst und es wurden 4.00 mL Trifluoressigsäure zugegeben. Es wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt, anschließend gegen 10 mL Wasser und 10 mL gesättigter NaHCO_3 -Lösung ausgeschüttelt. Die wässrigen Phasen wurden mehrfach mit Dichlormethan reextrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. 1.35 g (4.73 mmol, 99%) der Verbindung **(34)** konnten als farbloses Pulvers erhalten werden.

Schmp.: 175 °C.

¹H-NMR: (600 MHz, DMSO-d₆); δ = 5.32 ppm (bs, 1 H, 6-OH), 5.21 ppm (d, $^3J_{8a-H,8-H}$ = 1.9 Hz, 1 H, 8a-H), 4.73 ppm (dd, $^3J_{3-H,2-H^{proR}}$ = 7.2 Hz, $^3J_{3-H,2-H^{proS}}$ = 2.4 Hz, 1 H, 3-H), 4.56 ppm (dd, $^3J_{8-H,7-H}$ = 7.7 Hz, $^3J_{8-H,8a-H}$ = 2.0 Hz, 1 H, 8-H), 4.53 ppm (dd, $^3J_{7-H,8-H}$ = 7.7 Hz, $^3J_{7-H,6-H}$ = 3.0 Hz, 1 H, 7-H), 4.26 ppm (dd, $^2J_{2-H^{proR},2-H^{proS}}$ = 8.3 Hz, $^3J_{2-H^{proR},3-H}$ = 7.2 Hz, 1 H, 2-H^{proR}), 4.20 ppm (d, $^3J_{6-H,7-H}$ = 3.0 Hz, 1 H, 6-H), 4.11 ppm (dd, $^2J_{2-H^{proS},2-H^{proR}}$ = 8.4 Hz, $^3J_{2-H^{proS},3-H}$ = 2.5 Hz, 1 H, 2-H^{proS}), 3.68 ppm (s, 3 H, CO₂CH₃), 1.25 ppm (s, 6 H, Isopr.-CH₃).

¹³C-NMR: (150 MHz, DMSO-d₆); δ = 170.1 ppm (CO₂CH₃), 166.5 ppm (5-CO), 109.1 ppm (Isopr._{quart.}), 84.9 ppm (8a-C), 75.4 ppm (7-C), 74.5 ppm (8-C), 69.9 ppm (2-C), 68.8 ppm (6-C), 55.6 ppm (3-C), 52.4 ppm (CO₂CH₃), 26.2 ppm (Isopr.-CH₃), 24.0 ppm (Isopr.-CH₃).

HRMS (ESI): für C₁₂H₁₇NO₇Na⁺ (M+Na⁺), ber.: 310.0897, gef.: 310.0899.

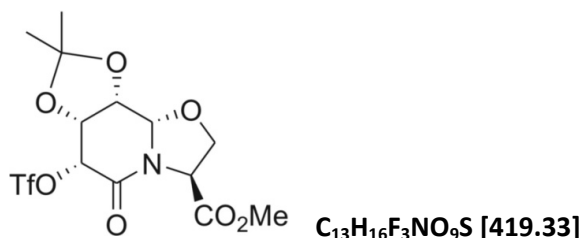
CHN-Analyse: ber.: C: 50.17% H: 5.96% N: 4.88%
gef.: C: 44.64% H: 6.52% N: 3.45%.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3467 w, 2980 w, 2962 w, 1735 s, 1687 s, 1456 m, 1374 m, 1257 s, 1211 m, 1009 m, 955 w, 898 w, 850 w, 795 s, 696 w, 646 w.

Drehwert: $[\alpha]_D^{22.0} = -89.2$, $[\alpha]_{578}^{22.0} = -93.2$, $[\alpha]_{546}^{22.0} = -106.3$, $[\alpha]_{436}^{22.0} = -185.4$,

(c = 0.973 g/100 mL, CHCl₃).

8a(S)H-(7R,8R)-O-isopropyliden-5oxo-(6R)-trifluoromethansulfonyloxy-hexahydro-oxazolo[3,2-a]pyridin-3(R)-carbonsäure-methylester (35)



1.35 g (4.73 mmol, 1.0 eq) der Verbindung **(34)** wurden in 50.0 mL trockenem Dichlormethan gelöst, es wurden 2.00 mL trockenes Pyridin zugegeben und der Ansatz im Eisbad auf 0 °C herabgekühlt. Unter Rühren wurden 1.17 mL Trifluormethansulfonsäureanhydrid (6.96 mmol, 1.5 eq) in 5.00 mL trockenem Dichlormethan langsam zugegeben. Der Ansatz wurde für weitere zehn Minuten bei 0 °C gerührt, daraufhin wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 g Eis abgebrochen. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase noch zwei Mal mit je 50.0 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit HCl (c = 1 mol/L) und mit gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen und auch diese wässrigen Phasen wurde mehrfach reextrahiert. Die organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und eingeeengt. Nach dem Trocknen am Hochvakuum wurden 1.50 g (3.58 mmol, 76%) der Verbindung **(35)** als blass-gelber Feststoff erhalten.

Schmp.: 179 °C.

¹H-NMR: (600 MHz, DMSO_{d6}); δ = 5.91 ppm (d, ³J_{6-H,7-H} = 3.6 Hz, 1 H, 6-H), 5.45 ppm (d, ³J_{8a-H,8-H} = 2.1 Hz, 1 H, 8a-H), 4.89 ppm (dd, ³J_{3-H,2-H^{proR}} = 7.0 Hz, ³J_{3-H,2-H^{proS}} = 2.5 Hz, 1 H, 3-H), 4.88 ppm (dd, ³J_{7-H,8-H} = 7.7 Hz, ³J_{7-H,6-H} = 3.7 Hz, 1 H, 7-H), 4.87 ppm (dd, ³J_{8-H,7-H} = 7.7 Hz, ³J_{8-H,8a-H} = 2.2 Hz, 1 H, 8-H), 4.27 ppm (dd, ²J_{2-H^{proR},2-H^{proS}} = 8.5 Hz, ³J_{2-H^{proR},3-H} = 7.0 Hz, 1 H, 2-H^{proR}), 4.18 ppm (dd, ²J_{2-H^{proS},2-H^{proR}} = 8.4 Hz, ³J_{2-H^{proS},3-H} = 2.3 Hz, 1 H, 2-H^{proS}), 3.71 ppm (s, 3 H, CO₂CH₃), 1.31 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃^t), 1.30 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃^h).

¹³C-NMR: (150 MHz, DMSO_{d6}); δ = 169.9 ppm (CO₂CH₃), 159.7 ppm (5-CO), 111.3 ppm (Isopr._{quart.}), 85.0 ppm (8a-C), 82.0 ppm (6-C), 75.4 ppm (8-C), 73.3 ppm (7-C), 70.6 ppm (2-C), 56.4 ppm (3-C), 53.2 ppm (CO₂CH₃), 26.4 ppm (Isopr.-CH₃), 24.5 ppm (Isopr.-CH₃).

HRMS (ESI): für C₁₃H₁₆F₃NO₉Na⁺ (M+Na⁺), ber.: 422.0390, gef.: 422.0394.

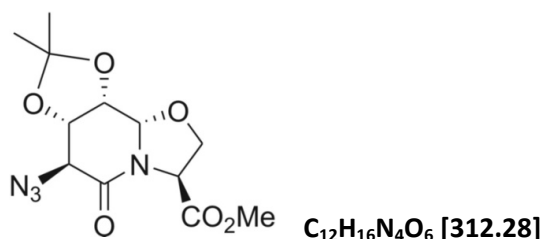
CHN-Analyse: ber.: C: 37.24% H: 3.85% N: 3.34%
gef.: C: 37.08% H: 4.07% N: 3.12%.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 2980 w, 1750 s, 1702 s, 1471 w, 1417 s, 1207 s, 1215 s, 1140 m, 1087 w, 1001 m, 903 m.

Drehwert: $[\alpha]_D^{22.0} = -38.6$, $[\alpha]_{578}^{22.0} = -40.2$, $[\alpha]_{546}^{22.0} = -45.8$, $[\alpha]_{436}^{22.0} = -79.7$,

(c = 0.990 g/100 mL, CHCl₃).

8a(S)H-(6S)-azido-(7S,8R)-O-isopropyliden-5oxo-hexahydro-oxazolo[3,2-a]pyridine-3(R)-carbonsäure-methylester (36)



1.30 g (3.1 mmol, 1.0 eq) der Verbindung **(35)** wurden in 20.0 mL DMF gelöst, es wurden 1.00 g (15.4 mmol, 5.0 eq) Natriumazid zugegeben und bei Raumtemperatur für 16 Stunden gerührt. Zu dem Ansatz wurden 100 mL Wasser gegeben und drei Mal mit je 50.0 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit HCl (c = 1 mol/L) gewaschen und auch diese wässrigen Phasen wurde mehrfach reextrahiert. Die organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach dem Trocknen am Hochvakuum wurden 0.98 g (3.10 mmol, 99%) des Azids **(36)** als blass gelbes Öl erhalten.

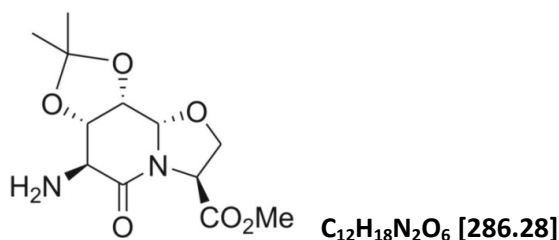
¹H-NMR: (600 MHz, DMSO_{d6}); δ = 5.31 ppm (d, ³J_{8a-H,8-H} = 2.3 Hz, 1 H, 8a-H), 4.81 ppm (dd, ³J_{3-H,2-H^{proR}} = 6.9 Hz, ³J_{3-H,2-H^{proS}} = 3.2 Hz, 1 H, 3-H), 4.72 ppm (dd, ³J_{8-H,7-H} = 7.1 Hz, ³J_{8-H,8a-H} = 2.2 Hz, 1 H,

8-H), 4.49 ppm (dd, $^3J_{7-H,8-H} = 7.0$ Hz, $^3J_{7-H,6-H} = 2.2$ Hz, 1 H, 7-H), 4.46 ppm (d, $^3J_{6-H,7-H} = 2.2$ Hz, 1 H, 6-H), 4.24 ppm (dd, $^2J_{2-H^{proR},2-H^{proS}} = 8.6$ Hz, $^3J_{2-H^{proR},3-H} = 7.0$ Hz, 1 H, 2-H^{proR}), 4.12 ppm (dd, $^2J_{2-H^{proS},2-H^{proR}} = 8.4$ Hz, $^3J_{2-H^{proS},3-H} = 3.1$ Hz, 1 H, 2-H^{proS}), 3.70 ppm (s, 3 H, CO₂CH₃), 1.28 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃^t), 1.27 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃^h).

¹³C-NMR: (150 MHz, DMSO_{d6}); $\delta = 169.4$ ppm (CO₂CH₃), 162.4 ppm (5-CO), 109.5 ppm (Isopr.^{quart.}), 85.2 ppm (8a-C), 73.7 ppm (7-C), 73.4 ppm (8-C), 69.1 ppm (2-C), 61.4 ppm (6-C), 55.5 ppm (3-C), 52.6 ppm (CO₂CH₃), 26.0 ppm (Isopr.-CH₃), 23.9 ppm (Isopr.-CH₃).

HRMS (ESI): für C₁₂H₁₆N₄O₆Na⁺ (M+Na⁺), ber.: 335.0962, gef.: 335.0966.

8a(S)H-(6S)-amino-(7S,8R)-O-isopropyliden-5oxo-hexahydro-oxazolo[3,2-a]pyridin-3(R)-carbonsäure-methylester(37)



0.94 g (3.01 mmol) der Verbindung **(36)** wurden in 20.0 mL MeOH/EE 1:1 gelöst und mit 0.10 g Palladium auf Aktivkohle (10%ig) versetzt. Der Ansatz wurde für einen Tag unter einer Wasserstoffatmosphäre von 10 bar im Autoklaven gerührt. Zum Abtrennen des Katalysators wurde über Kieselgur filtriert, das Filtrat eingeeengt und am Hochvakuum getrocknet. Es wurden 720 mg (2.52 mmol, 84%) der Verbindung **(37)** als farbloser Feststoff erhalten.

Schmp.: 92.0 °C

¹H-NMR: (600 MHz, DMSO_{d6}); $\delta = 5.62$ ppm (d, $^3J_{8a-H,8-H} = 2.3$ Hz, 1 H, 8a-H), 4.69 ppm (dd, $^3J_{3-H,2-H^{proR}} = 7.0$ Hz, $^3J_{3-H,2-H^{proS}} = 2.9$ Hz, 1 H, 3-H), 4.62 ppm (dd, $^3J_{8-H,7-H} = 7.2$ Hz, $^3J_{8-H,8a-H} = 2.4$ Hz, 1 H, 8-H), 4.34 ppm (dd, $^3J_{7-H,8-H} = 7.2$ Hz, $^3J_{7-H,6-H} = 2.2$ Hz, 1 H, 7-H), 4.20 ppm (dd, $^2J_{2-H^{proR},2-H^{proS}} = 8.4$ Hz, $^3J_{2-H^{proR},3-H} = 7.1$ Hz, 1 H, 2-H^{proR}), 4.05 ppm (dd, $^2J_{2-H^{proS},2-H^{proR}} = 8.4$ Hz, $^3J_{2-H^{proS},3-H} = 2.8$ Hz, 1 H, 2-H^{proS}), 3.67 ppm (s, 3 H, CO₂CH₃), 3.47 ppm (d, $^3J_{6-H,7-H} = 2.1$ Hz, 1 H, 6-H), 1.98 ppm (bs, 2H, 6-NH₂), 1.25 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃^t), 1.24 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃^h).

¹³C-NMR: (150 MHz, DMSO_{d6}); $\delta = 170.1$ ppm (CO₂CH₃), 168.1 ppm (5-CO), 108.6 ppm (Isopr.^{quart.}), 85.2 ppm (8a-C), 76.5 ppm (7-C), 74.1 ppm (8-C), 68.8 ppm (2-C), 56.5 ppm (6-C), 55.5 ppm (3-C), 52.3 ppm (CO₂CH₃), 26.2 ppm (Isopr.-CH₃), 23.8 ppm (Isopr.-CH₃).

HRMS (ESI): für C₁₂H₁₉N₂O₆⁺ (M+H⁺), ber.: 287.1238, gef.: 287.1234.

CHN-Analyse:

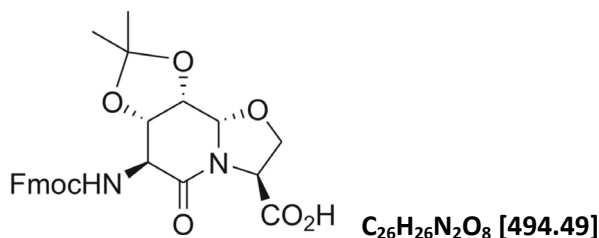
ber.: C: 50.35%	H: 6.34%	N: 9.79%
gef.: C: 50.19%	H: 6.43%	N: 9.65%.

IR (KBr): $\hat{\nu}$ = 3334 m, 3312 w, 2989 m, 2972 m, 2939 w, 2897 w, 1751 s, 1669 s, 1452 m, 1375 m, 1205 s, 1058 s, 835 s.

Drehwert: $[\alpha]_{\text{D}}^{17.0} = -138.6$, $[\alpha]_{578}^{17.0} = -144.9$, $[\alpha]_{546}^{17.0} = -166.1$, $[\alpha]_{436}^{17.0} = -296.9$, $[\alpha]_{365}^{17.0} = -482.9$,

(c = 1.057 g/100 mL, MeOH).

8a(S)H-6(S)-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-(7S,8R)-O-isopropyliden-5oxo-hexahydro-oxazolo[3,2-a]pyridin-3(R)-carbonsäure (38)



500 mg (1.75 mmol, 1.0 eq) der Verbindung **(37)** wurden in etwa 20 ml 1,4-Dioxan mit wenig Wasser gelöst, es erfolgte die Zugabe von 3.5 mL LiOH (c = 1 mol/L). Nach etwa zehn Minuten wurde der Ansatz mit HCl (c = 1 mol/L) neutralisiert, das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand am Hochvakuum getrocknet.

Das verseifte Dipeptid wurde in 20 mL 1,4-Dioxan/Wasser 4:1 gelöst und auf 0 °C herabgekühlt, anschließend wurden langsam 700 mg (2.28 mmol, 1.3 eq) Fmoc-OSu in 5 mL 1,4-Dioxan zugegeben. Der pH-Wert wurde mittels DIPEA auf etwa 9 eingestellt. Es wurde für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, eine anschließende DC-Kontrolle (DCM/MeOH 5:1; R_f = 0.17) zeigte den vollständigen Umsatz der Reaktion an, daraufhin wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in etwa 200 mL Essigsäureethylester und 50 ml Wasser aufgenommen, die wässrige Phase wurde mit HCl (c = 1 mol/L) auf pH = 2 eingestellt und abgetrennt. Anschließend wurde noch mehrmals mit Essigsäureethylester extrahiert, die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet. Der Rückstand wurde abschließend säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 20:1 → DCM/MeOH 10:1). Nach Entfernen des Lösungsmittels und trockenem am Hochvakuum wurden 800 mg (1.62 mmol, 93%) des Produkts als farbloser Feststoff erhalten.

Schmp.: 215.0 °C.

¹H-NMR: (600 MHz, DMSO-d₆); δ = 8.09 ppm (bs, 1H, 6-NH), 7.88 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.6$ Hz, 2 H, Fmoc_{arom.}), 7.75-7.69 ppm (m, 2 H, Fmoc_{arom.}), 7.41 ppm (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.6$ Hz, 2 H, Fmoc_{arom.}), 7.34 ppm (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 2 H, Fmoc_{arom.}), 5.49 ppm (s, 1 H, 8a-H), 4.61 ppm (dd, $^3J_{8\text{-H},7\text{-H}} = 7.1$ Hz, $^3J_{8\text{-H},8\text{a-H}} = 2.4$ Hz, 1 H, 8-H), 4.41 ppm (dd, $^3J_{7\text{-H},8\text{-H}} = 7.0$ Hz, $^3J_{7\text{-H},6\text{-H}} = 1.6$ Hz, 1 H, 7-H), 4.37-4.33 ppm (m, 1H, 3-H), 4.33-4.20 ppm (m, 3H, Fmoc-CH₂/ Fmoc-CH), 4.11-4.02 ppm (m, 3H, 2-H/6-H), 1.26 ppm (bs, 6 H, Isopr.-CH₃).

^{13}C -NMR: (150 MHz, DMSO-d_6); δ = 173.2 ppm (CO_2H), 163.0 ppm (5-CO), 156.0 ppm (Fmoc-CO), 140.7 ppm (Fmoc_{quart.}), 140.7 ppm (Fmoc_{quart.}), 127.7 ppm (C-Fmoc_{arom.}), 127.1 ppm (C-Fmoc_{arom.}), 125.3 ppm (C-Fmoc_{arom.}), 120.1 ppm (C-Fmoc_{arom.}), 108.7 ppm (Isopr._{quart.}), 84.6 ppm (8a-C), 75.0 ppm (7-C), 74.1 ppm (8-C), 70.1 ppm (2-C), 66.2 ppm (Fmoc-CH₂), 58.2 ppm (3-C), 55.0 ppm (6-C), 46.6 ppm (Fmoc-CH), 26.3 ppm (Isopr.-CH₃), 24.0 ppm (Isopr.-CH₃).

HRMS (ESI): für $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_8^+$ ($\text{M}+\text{NH}_4^+$), ber.: 512.2027, gef.: 512.2030.

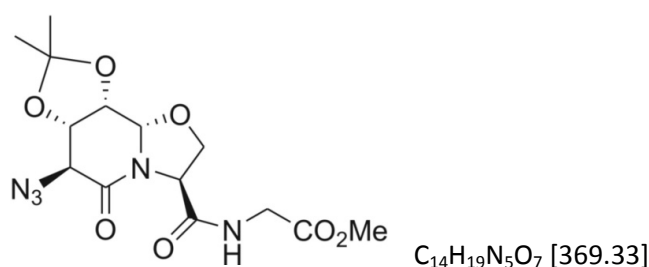
CHN-Analyse: ber.: C: 63.15% H: 5.30% N: 5.67%
gef.: C: 57.89% H: 5.04% N: 5.14%.

IR (KBr): $\hat{\nu}$ = 2985 w, 2936 w, 1652 s, 1410 m, 1211 s, 1052 m, 737 s.

Drehwert: $[\alpha]_{\text{D}}^{15.0} = -61.4$, $[\alpha]_{578}^{15.0} = -67.0$, $[\alpha]_{546}^{15.0} = -77.5$, $[\alpha]_{436}^{15.0} = -143.2$, $[\alpha]_{365}^{15.0} = -242.5$,

($c = 1.054 \text{ g}/100 \text{ mL}$, CHCl_3).

(6S)-azido-Pli^P=Cat^O-Gly-OMe (39)



220 mg (0.71 mmol, 1.0 eq) der Verbindung **(36)** wurden in 5.00 mL 1,4-Dioxan/Wasser gelöst, es erfolgte die Zugabe von 1 mL (1.0 mmol, 1.4 eq) 1N LiOH. Durch DC-Kontrolle (Essigsäureethylester) wurde der Reaktionsfortschritt verfolgt. Nach vollständiger Hydrolyse des Esters wurde mit 1N HCl neutralisiert, das Lösungsmittel entfernt, zwei Mal mit Ethanol/Toluol koevaporiert und der Ansatz am Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde in 10.0 mL DMF aufgenommen, es wurden 530 mg (1.4 mmol, 2.0 eq) HBTU, 214 mg (1.4 mmol, 2.0 eq) HOBT und 175 mg (1.4 mmol, 2.0 eq) Glycinmethylester-HCl zugegeben. Der pH-Wert wurde durch DIPEA-Zugabe auf pH = 9 eingestellt und der Ansatz für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand mit 100 mL Essigsäureethylester aufgenommen und gegen jeweils 50.0 mL Salzsäure ($c = 0.5 \text{ mol/L}$), gesättigte NaHCO_3 -Lösung sowie gesättigte NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde abschließend säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/EE 1:1; $R_f = 0.57$). Es wurden 250 mg (0.68 mmol, 96%) der Verbindung **(39)** in Form eines farblosen Pulvers erhalten.

Schmp.: 63.0 °C.

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO_{d6}); δ = 8.47 ppm (t, $^3J_{\text{Gly-NH,Gly-CH}_2}$ = 5.9 Hz, 1 H, Gly-NH), 5.32 ppm (d, $^3J_{8\text{-H},8\text{-H}}$ = 2.1 Hz, 1 H, 8a-H), 4.70 ppm (dd, $^3J_{8\text{-H},7\text{-H}}$ = 7.0 Hz, $^3J_{8\text{-H},8\text{a-H}}$ = 2.2 Hz, 1 H, 8-H), 4.65 ppm (dd, $^3J_{3\text{-H},2\text{-H}^{\text{proR}}}$ = 7.0 Hz, $^3J_{3\text{-H},2\text{-H}^{\text{proS}}}$ = 3.5 Hz, 1 H, 3-H), 4.48 ppm (dd, $^3J_{7\text{-H},8\text{-H}}$ = 7.0 Hz, $^3J_{7\text{-H},6\text{-H}}$ = 2.2 Hz, 1 H, 7-H), 4.42 ppm (d, $^3J_{6\text{-H},7\text{-H}}$ = 2.2 Hz, 1 H, 6-H), 4.21 ppm (dd, $^2J_{2\text{-H}^{\text{proR}},2\text{-H}^{\text{proS}}}$ = 8.1 Hz, $^3J_{2\text{-H}^{\text{proR}},3\text{-H}}$ = 7.1 Hz, 1 H, 2-H^{proR}), 3.98 ppm (dd, $^2J_{2\text{-H}^{\text{proS}},2\text{-H}^{\text{proR}}}$ = 8.2 Hz, $^3J_{2\text{-H}^{\text{proS}},3\text{-H}}$ = 3.4 Hz, 1 H, 2-H^{proS}), 3.96 ppm (dd, $^2J_{\alpha^{\text{t-H}},\alpha^{\text{h-H}}}$ = 17.4 Hz, $^3J_{\beta^{\text{t-H}},\text{N-H}}$ = 5.8 Hz, 1 H, $\alpha^{\text{t-H}}$), 3.88 ppm (dd, $^2J_{\alpha^{\text{h-H}},\alpha^{\text{t-H}}}$ = 17.5 Hz, $^3J_{\alpha^{\text{h-H}},\text{N-H}}$ = 5.7 Hz, 1 H, $\alpha^{\text{h-H}}$), 3.64 ppm (s, 3 H, CO₂CH₃), 1.28 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃^t), 1.27 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃^h).

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO_{d6}); δ = 170.0 ppm (C=O₂CH₃), 168.9 ppm (3-CO), 162.6 ppm (5-CO), 109.4 ppm (Isopr._{quart.}), 85.6 ppm (8a-C), 73.8 ppm (7-C), 73.6 ppm (8-C), 69.8 ppm (2-C), 61.6 ppm (6-C), 56.4 ppm (3-C), 51.7 ppm (CO₂CH₃), 40.6 ppm (α -C), 26.1 ppm (Isopr.-CH₃), 24.0 ppm (Isopr.-CH₃).

HRMS (ESI): für C₁₄H₁₉N₅O₇Na⁺ (M+Na⁺), ber.: 392.1177, gef.: 392.1182.

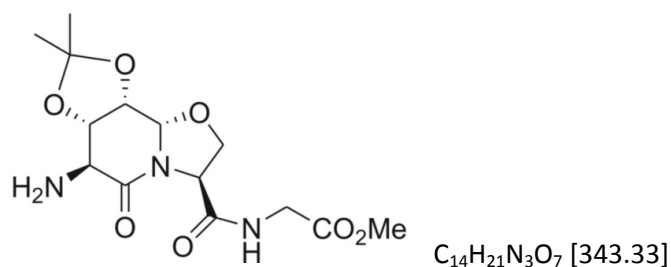
CHN-Analyse: ber.: C: 45.53% H: 5.19% N: 18.96%
gef.: C: 38.74% H: 4.66% N: 15.55%.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3338 br, 2989 w, 2952 w, 2112 s, 1749 s, 1672 s, 1537 m, 1439 m, 1377 m, 1209 s, 1063 m, 835 s.

Drehwert: $[\alpha]_{\text{D}}^{15.0} = -189.9$, $[\alpha]_{578}^{15.0} = -199.0$, $[\alpha]_{546}^{15.0} = -229.3$, $[\alpha]_{436}^{15.0} = -425.2$, $[\alpha]_{365}^{15.0} = -740.3$,

(c = 0.858 g/100 mL, CHCl₃/MeOH 4:1).

(6S)-amino-Pli^P=Cat^O-Gly-OMe (**40**)



230 mg (0.62 mmol) der Verbindung (**39**) wurden in 5.00 mL MeOH/EE 1:1 gelöst und mit 30.0 mg Palladium auf Aktivkohle (10%ig) versetzt. Der Ansatz wurde für sieben Stunden unter einer Wasserstoffatmosphäre von 1 bar gerührt. Zum Abtrennen des Katalysators wurde über Kieselgur filtriert, das Filtrat eingengt und am Hochvakuum getrocknet. Es wurden 180 mg (0.52 mmol, 84%) der Verbindung (**40**) als farbloser, kristalliner Feststoff erhalten.

Schmp.: 176.0 °C.

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO_{d6}); δ = 8.19 ppm (t, $^3J_{\text{Gly-NH,Gly-CH}_2}$ = 5.8 Hz, 1 H, Gly-NH), 5.64 ppm (d, $^3J_{8\text{-H},8\text{-H}}$ = 2.1 Hz, 1 H, 8a-H), 4.63 ppm (dd, $^3J_{8\text{-H},7\text{-H}}$ = 7.2 Hz, $^3J_{8\text{-H},8\text{a-H}}$ = 2.2 Hz, 1 H, 8-H), 4.61 ppm (dd,

$^3J_{3-H,2-H^{proR}} = 7.1$ Hz, $^3J_{3-H,2-H^{proS}} = 2.6$ Hz, 1 H, 3-H), 4.31 ppm (dd, $^3J_{7-H,8-H} = 7.1$ Hz, $^3J_{7-H,6-H} = 2.0$ Hz, 1 H, 7-H), 4.14 ppm (dd, $^2J_{2-H^{proR},2-H^{proS}} = 7.9$ Hz, $^3J_{2-H^{proR},3-H} = 7.2$ Hz, 1 H, 2-H^{proR}), 4.02 ppm (dd, $^2J_{2-H^{proS},2-H^{proR}} = 7.9$ Hz, $^3J_{2-H^{proS},3-H} = 2.6$ Hz, 1 H, 2-H^{proS}), 3.87 ppm (d, $^3J_{\alpha-H,N-H} = 6.1$ Hz, 2 H, α -CH₂), 3.63 ppm (s, 3 H, CO₂CH₃), 3.46 ppm (d, $^3J_{6-H,7-H} = 2.2$ Hz, 1 H, 6-H), 2.07 ppm (bs, 2H, NH₂), 1.25 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃^t), 1.24 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃^h).

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO_{d6}); $\delta = 169.9$ ppm (CO₂CH₃), 169.8 ppm (3-CO), 168.9 ppm (5-CO), 108.5 ppm (Isopr.-quart.), 85.6 ppm (8a-C), 76.7 ppm (7-C), 74.6 ppm (8-C), 69.1 ppm (2-C), 56.7 ppm (6-C), 56.6 ppm (3-C), 51.7 ppm (CO₂CH₃), 40.7 ppm (α -C), 26.3 ppm (Isopr.-CH₃), 23.9 ppm (Isopr.-CH₃).

HRMS (ESI): für C₁₄H₂₂N₃O₇⁺ (M+H⁺), ber.: 344.1452, gef.: 344.1450.

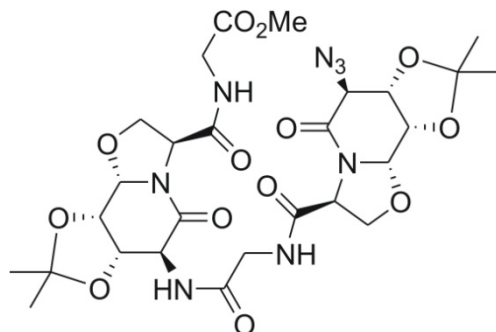
CHN-Analyse: ber.: C: 48.98% H: 6.17% N: 12.24%
gef.: C: 41.40% H: 5.45% N: 10.02%.

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3397$ m, 2984 w, 2907 w, 1758 s, 1661 s, 1521 s, 1426 m, 1374 m, 1207 s, 836 s.

Drehwert: $[\alpha]_D^{15.0} = -103.1$, $[\alpha]_{578}^{15.0} = -108.2$, $[\alpha]_{546}^{15.0} = -124.0$, $[\alpha]_{436}^{15.0} = -223.4$, $[\alpha]_{365}^{15.0} = -369.1$,

(c = 0.858 g/100 mL, CHCl₃/MeOH 1:4).

(6S)-azido-Pli^P=Cat^O-Gly-Pli^P=Cat^O-Gly-OMe (41)



C₂₇H₃₆N₈O₁₃ [680.62]

500 mg (1.36 mmol, 1.0 eq) der Verbindung **(39)** wurde in 5.00 mL 1,4-Dioxan/Wasser gelöst, anschließend wurden 2.00 mL (2.00 mmol, 1.5 eq) 1N LiOH zugegeben und bei Raumtemperatur gerührt. Mittels DC-Kontrolle (Essigsäureethylester) wurde der Reaktionsfortschritt kontrolliert. Nach vollständiger Hydrolyse des Esters wurde mit 1N HCl neutralisiert, das Lösungsmittel entfernt, zwei Mal mit Ethanol/Toluol ko-evaporiert und der Ansatz am Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde in 10.0 mL DMF aufgenommen, es folgte die Zugabe von 470 mg (1.37 mmol, 1.0 eq) der Verbindung **(40)**, 410 mg (2.70 mmol, 2.0 eq) HOBt und 1.02 g (2.70 mmol, 2.0 eq) HBTU. Der pH-Wert der Lösung wurde mit DIPEA auf pH = 8 eingestellt und der Ansatz bei Raumtemperatur für drei Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand mit 100 ml Essigsäureethylester aufgenommen und gegen jeweils 50.0 mL Salzsäure (c = 1.0 mol/L), gesättigte

NaHCO₃-Lösung sowie gesättigte NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Das Produkt wurde flashchromatographisch aufgereinigt (DCM/EE 1:1 → DCM/MeOH 10:1; DC-Kontrolle in DCM/MeOH 15:1 $R_f = 0.06$), dabei wurden 530 mg (0.78 mmol, 57%) der Verbindung (**41**) als farbloser Feststoff erhalten.

Schmp.: 132.0 °C.

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆); δ = 8.40 ppm (d, $^3J_{\text{Gly-NH},\alpha\text{-H}} = 5.6$ Hz, 1 H, Gly-NH), 8.30 ppm (t, $^3J_{\text{Gly'-NH},\alpha'\text{-H}} = 5.8$ Hz, 1 H, Gly'-NH), 8.23 ppm (d, $^3J_{6'\text{-NH},6'\text{-H}} = 6.7$ Hz, 1 H, 6'-NH), 5.53 ppm (d, $^3J_{8\text{a'-H},8'\text{-H}} = 1.9$ Hz, 1 H, 8a'-H), 5.30 ppm (d, $^3J_{8\text{a-H},8\text{-H}} = 2.1$ Hz, 1 H, 8a-H), 4.71 ppm (dd, $^3J_{8\text{-H},7\text{-H}} = 7.1$ Hz, $^3J_{8\text{-H},8\text{a-H}} = 2.1$ Hz, 1 H, 8-H), 4.68 ppm (dd, $^3J_{8'\text{-H},7'\text{-H}} = 7.0$ Hz, $^3J_{8'\text{-H},8\text{a'-H}} = 2.0$ Hz, 1 H, 8'-H), 4.63 ppm (dd, $^3J_{3\text{-H},2\text{-H}}^{\text{proR}} = 6.9$ Hz, $^3J_{3\text{-H},2\text{-H}}^{\text{proS}} = 4.0$ Hz, 1 H, 3-H), 4.60 ppm (dd, $^3J_{3'\text{-H},2'\text{-H}}^{\text{proR}} = 7.2$ Hz, $^3J_{3'\text{-H},2'\text{-H}}^{\text{proS}} = 3.2$ Hz, 1 H, 3'-H), 4.49 ppm (dd, $^3J_{7\text{-H},8\text{-H}} = 7.1$ Hz, $^3J_{7\text{-H},6\text{-H}} = 2.2$ Hz, 1 H, 7-H), 4.43-4.40 ppm (m, 2 H, 7'-H/6-H), 4.27-4.21 ppm (m, 3 H, 6'-H/2-H^{proR}/2'-H^{proR}), 4.02 ppm (dd, $^2J_{2'\text{-H}}^{\text{proS}},2'\text{-H}}^{\text{proR}} = 8.2$ Hz, $^3J_{2'\text{-H}}^{\text{proS}},3'\text{-H}} = 3.3$ Hz, 1 H, 2'-H^{proS}), 3.99 ppm (dd, $^2J_{2\text{-H}}^{\text{proS}},2\text{-H}}^{\text{proR}} = 8.3$ Hz, $^3J_{2\text{-H}}^{\text{proS}},3\text{-H}} = 4.1$ Hz, 1 H, 2-H^{proS}), 3.93-3.87 ppm (m, 1 H, $\alpha^{\text{T}}\text{-H}/\alpha'^{\text{T}}\text{-H}/\alpha^{\text{H}}\text{-H}$), 3.75 ppm (dd, $^2J_{\alpha\text{-H},\alpha\text{-H}} = 16.3$ Hz, $^3J_{\alpha\text{-H},\text{Gly-NH}} = 5.4$ Hz, 1 H, $\alpha^{\text{H}}\text{-H}$), 3.63 ppm (s, 3 H, OMe), 1.30-1.22 ppm (m, 12 H, Isopr.-CH₃).

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO-d₆); δ = 169.9 ppm (Gly'-CO₂Me), 169.5 ppm (3'-CO), 168.9 ppm (Gly-CO), 168.7 ppm (3-CO), 164.5 ppm (5'-CO), 162.8 ppm (5-CO) 109.5 ppm (Isopr.-quart.), 109.2 (Isopr.-quart.), 85.8 ppm (8a'-C), 85.6 ppm (8a-C), 74.7 ppm (7'-C), 74.4 ppm (8'-C), 73.9 ppm (7-C), 73.4 ppm (8-C), 70.0 ppm (2-C), 69.5 ppm (2'-C), 61.6 ppm (6-C), 57.2 ppm (3-C), 56.6 ppm (3'-C), 54.4 ppm (6'-C), 51.8 ppm (OCH₃), 42.0 ppm (α -C), 40.7 ppm (α' -C), 26.3 ppm (Isopr.-CH₃), 26.1 ppm (Isopr.-CH₃), 24.0 ppm (2x Isopr.-CH₃).

HRMS (ESI): für C₂₇H₄₀N₉O₁₃⁺ (M+NH₄⁺), ber.: 698.2740, gef.: 698.2743.

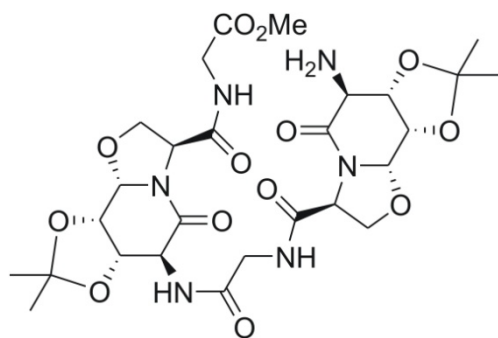
CHN-Analyse: ber.: C: 47.65% H: 5.33% N: 16.46%.

gef.: C: 46.04% H: 5.43% N: 15.68%.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3306 w, 2988 w, 2939 w, 2110 s, 1657 s, 1534 m, 1436 m, 1377 m, 1208 s, 1060 m, 839 m.

Drehwert: $[\alpha]_{\text{D}}^{16.0} = -128.8$, $[\alpha]_{578}^{16.0} = -135.0$, $[\alpha]_{546}^{16.0} = -155.3$, $[\alpha]_{436}^{16.0} = -285.8$, $[\alpha]_{365}^{16.0} = -489.1$,

(c = 1.162 g/100 mL, MeOH).

(6S)-amino-Pli^P=Cat^O-Gly-Pli^P=Cat^O-Gly-OMe (42)C₂₇H₃₈N₆O₁₃ [654.62]

480 mg (0.71 mmol) der Verbindung **(41)** wurden in 5.00 mL MeOH/DCM 1:1 gelöst und mit 60.0 mg Palladium auf Aktivkohle (10%ig) versetzt. Der Ansatz wurde für vier Tage unter einer Wasserstoffatmosphäre von 1 bar gerührt. Zum Abtrennen des Katalysators wurde über Kieselgur filtriert, das Filtrat eingeeengt und am Hochvakuum getrocknet. Es wurden 450 mg (0.68 mmol, 96%) der Verbindung **(42)** als farbloser, kristalliner Feststoff erhalten.

Schmp.: 145.0 °C.

¹H-NMR: (600 MHz, DMSO_{d6}); δ = 8.37 ppm (t, ³J_{Gly'-NH,α-H} = 5.9 Hz, 1 H, Gly'-NH), 8.22 ppm (d, ³J_{6'-NH,6'-H} = 6.7 Hz, 1 H, 6'-NH), 8.21 ppm (t, ³J_{Gly-NH,α-H} = 5.8 Hz, 1 H, Gly-NH), 5.63 ppm (d, ³J_{8a-H,8-H} = 2.3 Hz, 1 H, 8a-H), 5.57 ppm (d, ³J_{8a'-H,8'-H} = 2.1 Hz, 1 H, 8a'-H), 4.68 ppm (dd, ³J_{8'-H,7'-H} = 7.0 Hz, ³J_{8'-H,8a'-H} = 2.1 Hz, 1 H, 8'-H), 4.64 ppm (dd, ³J_{8-H,7-H} = 7.2 Hz, ³J_{8-H,8a-H} = 2.3 Hz, 1 H, 8-H), 4.58 ppm (dd, ³J_{3'-H,2'-H}^{proR} = 7.3 Hz, ³J_{3'-H,2'-H}^{proS} = 3.2 Hz, 1 H, 3'-H), 4.56 ppm (dd, ³J_{3-H,2-H}^{proR} = 7.1 Hz, ³J_{3-H,2-H}^{proS} = 3.8 Hz, 1 H, 3-H), 4.42 ppm (dd, ³J_{7'-H,8'-H} = 7.0 Hz, ³J_{7'-H,6'-H} = 1.8 Hz, 1 H, 7'-H), 4.33 ppm (dd, ³J_{7-H,8-H} = 7.2 Hz, ³J_{7-H,6-H} = 2.1 Hz, 1 H, 7-H), 4.25 ppm (dd, ²J_{2'-H}^{proR}, ²J_{2'-H}^{proS} = 8.3 Hz, ³J_{2'-H}^{proR}, ³J_{2'-H}^{proS} = 7.2 Hz, 1 H, 2'-H^{proR}), 4.24 ppm (d, ³J_{6'-H,7'-H} = 2.0 Hz, 1 H, 6'-H), 4.18 ppm (dd, ²J_{2-H}^{proR}, ²J_{2-H}^{proS} = 8.1 Hz, ³J_{2-H}^{proR}, ³J_{2-H}^{proS} = 7.0 Hz, 1 H, 2-H^{proR}), 4.02 ppm (dd, ²J_{2'-H}^{proS}, ²J_{2'-H}^{proR} = 8.2 Hz, ³J_{2'-H}^{proS}, ³J_{2'-H}^{proR} = 3.2 Hz, 1 H, 2'-H^{proS}), 4.00 ppm (dd, ²J_{2-H}^{proS}, ²J_{2-H}^{proR} = 8.1 Hz, ³J_{2-H}^{proS}, ³J_{2-H}^{proR} = 3.6 Hz, 1 H, 2-H^{proS}), 3.89 ppm (dd, ²J_{α-H,α-H} = 17.5 Hz, ³J_{α-H,Gly-NH} = 5.9 Hz, 1 H, α^T-H), 3.85 ppm (dd, ²J_{α-H,α-H} = 17.5 Hz, ³J_{α-H,Gly-NH} = 6.2 Hz, 1 H, α^H-H), 3.83 ppm (dd, ²J_{α'-H,α'-H} = 16.7 Hz, ³J_{α'-H,Gly'-NH} = 6.0 Hz, 1 H, α^T-H), 3.77 ppm (dd, ²J_{α'-H,α'-H} = 16.7 Hz, ³J_{α'-H,Gly'-NH} = 5.6 Hz, 1 H, α^H-H), 3.63 ppm (s, 3 H, OMe), 3.47 ppm (dd, ³J_{6-H,7-H} = 2.2 Hz, 1 H, 6-H), 1.28 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃), 1.27 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃), 1.25 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃), 1.24 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃).

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO_{d6}); δ = 169.8 ppm (Gly'-CO₂Me), 169.5 ppm (3'-CO), 169.3 ppm (3-CO), 169.1 ppm (5-CO), 169.0 ppm (Gly-CO), 164.5 ppm (5'-CO), 109.1 ppm (Isopr._{quart.}), 108.5 ppm (Isopr._{quart.}), 85.8 ppm (8a'-C), 85.6 ppm (8a-C), 76.7 ppm (7-C), 74.7 ppm (7'-C), 74.4 ppm (8'-C), 74.3 ppm (8-C), 69.6 ppm (2'-C), 69.2 ppm (2-C), 57.4 ppm (3'-C), 57.0 ppm (3-C), 56.6 ppm (6-C), 54.4 ppm (6'-C), 51.7 ppm (OCH₃), 42.0 ppm (α-C), 40.7 ppm (α'-C), 26.2 ppm (2x Isopr.-CH₃), 24.0 ppm (Isopr.-CH₃), 23.9 ppm (Isopr.-CH₃).

HRMS (ESI): für $C_{27}H_{39}N_6O_{13}^+$ ($M+H^+$), ber.: 655.2570, gef.: 655.2571.

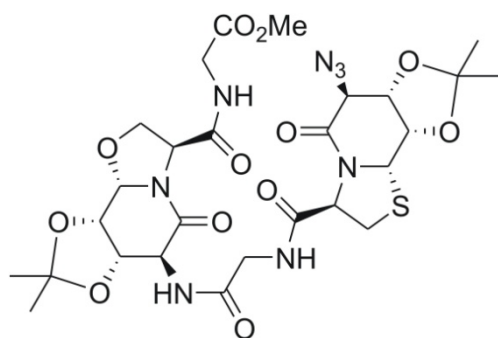
CHN-Analyse: ber.: C: 49.54% H: 5.85% N: 12.84%
gef.: C: 46.75% H: 6.02% N: 11.89%.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3294 br, 2987 w, 2938 w, 1655 s, 1534 m, 1435 m, 1376 m, 1208 s, 1057 m, 840 m.

Drehwert: $[\alpha]_D^{16.0} = -93.1$, $[\alpha]_{578}^{16.0} = -97.2$, $[\alpha]_{546}^{16.0} = -111.7$, $[\alpha]_{436}^{16.0} = -203.5$, $[\alpha]_{365}^{16.0} = -340.4$,

(c = 1.024 g/100 mL, MeOH).

(6S)-azido-Pli^P=Cat-Gly-Pli^P=Cat^O-Gly-OMe (43)



$C_{27}H_{36}N_8O_{12}S$ [696.69]

225 mg (0.58 mmol, 1.0 eq) der Verbindung **(9)** wurde in 5.00 mL 1,4-Dioxan/Wasser gelöst, anschließend wurden 0.90 mL (2.00 mmol, 1.5 eq) 1N LiOH zugegeben und bei Raumtemperatur gerührt. Mittels DC-Kontrolle (Essigsäureethylester) wurde der Reaktionsfortschritt kontrolliert. Nach vollständiger Hydrolyse des Esters wurde mit 1N HCl neutralisiert, das Lösungsmittel entfernt, zwei Mal mit Ethanol/Toluol koevaporiert und der Ansatz am Hochvakuum getrocknet.

Der Rückstand wurde in 10.0 mL DMF aufgenommen, es folgte die Zugabe von 200 mg (0.58 mmol, 1.0 eq) der Verbindung **(40)**, 180 mg (1.20 mmol, 2.0 eq) HOBt und 450 mg (1.20 mmol, 2.0 eq) HBTU. Der pH-Wert der Lösung wurde mit DIPEA auf pH = 8 eingestellt und der Ansatz bei Raumtemperatur für drei Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand mit 100 ml Essigsäureethylester aufgenommen und gegen jeweils 50.0 mL Salzsäure (c = 1.0 mol/L), gesättigte $NaHCO_3$ -Lösung sowie gesättigte NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Das Produkt wurde zwei Mal flashchromatographisch aufgereinigt, zuerst (DCM/EE 1:1 → DCM/MeOH 10:1; DC-Kontrolle in DCM/MeOH 10:1 R_f = 0.34), anschließend nochmals (DCM/MeOH 15:1). Insgesamt wurden 310 mg (0.45 mmol, 78%) der Verbindung **(43)** als farbloser Feststoff erhalten.

Schmp.: 129.0 °C.

¹H-NMR: (500 MHz, $DMSO-d_6$); δ = 8.31 ppm (t, $^3J_{Gly'-NH, \beta-H} = 5.7$ Hz, 1 H, Gly'-NH), 8.20 ppm (d, $^3J_{6'-NH, 6'-H} = 6.7$ Hz, 1 H, 6'-NH), 8.18 ppm (t, $^3J_{Gly-NH, \alpha-H} = 5.7$ Hz, 1 H, Gly-NH), 5.53 ppm (d, $^3J_{8a'-H, 8'-H} = 1.9$ Hz, 1 H, 8a'-H), 5.14 ppm (d, $^3J_{8a-H, 8-H} = 1.8$ Hz, 1 H, 8a-H), 5.08 ppm (dd, $^3J_{3-H, 2-H}^{proR} = 6.1$ Hz, $^3J_{3-H, 2-H}^{proS} = 2.0$ Hz, 1 H, 3-H), 4.68 ppm (dd, $^3J_{8'-H, 7'-H} = 6.9$ Hz, $^3J_{8'-H, 8a'-H} = 2.0$ Hz, 1 H, 8'-H), 4.60 ppm (dd, $^3J_{3'-H, 2'-H}^{proR} = 7.1$ Hz, $^3J_{3'-H, 2'-H}^{proS} = 3.7$ Hz, 1 H, 3'-H), 4.56 ppm (dd, $^3J_{8-H, 7-H} = 7.1$ Hz,

$^3J_{8-H,8a-H} = 2.0$ Hz, 1 H, 8-H), 4.51 ppm (dd, $^3J_{7-H,8-H} = 7.2$ Hz, $^3J_{7-H,6-H} = 2.3$ Hz, 1 H, 7-H), 4.44 ppm (d, $^3J_{6-H,7-H} = 2.3$ Hz, 1 H, 6-H), 4.42 ppm (dd, $^3J_{7'-H,8'-H} = 7.1$ Hz, $^3J_{7'-H,6'-H} = 1.8$ Hz, 1 H, 7'-H), 4.27-4.22 ppm (m, 2 H, 6'-H/2'-H^{proR}-H), 4.02 ppm (dd, $^2J_{2'-H}^{proS}, 2'-H}^{proR} = 8.2$ Hz, $^3J_{2'-H}^{proS}, 3'-H} = 2.3$ Hz, 1 H, 2'-H^{proS}), 3.92-3.86 ppm (m, 3 H, α' -H/ α^T -H), 3.74 ppm (dd, $^2J_{\alpha-H, \alpha-H} = 16.7$ Hz, $^3J_{\alpha-H, Gly-NH} = 5.1$ Hz, 1 H, α^H -H), 3.64 ppm (s, 3 H, OMe), 3.13 ppm (dd, $^2J_{2-H}^{proR}, 2-H}^{proS} = 11.3$ Hz, $^3J_{2-H}^{proR}, 3-H} = 6.3$ Hz, 1 H, 2-H^{proR}), 3.09 ppm (dd, $^2J_{2-H}^{proS}, 2-H}^{proR} = 11.3$ Hz, $^3J_{2-H}^{proS}, 3-H} = 2.0$ Hz, 1 H, 2-H^{proS}), 1.30-1.25 ppm (m, 12 H, Isopr.-CH₃).

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO-*d*₆); $\delta = 170.0$ ppm (Gly'-CO₂Me), 169.5 ppm (3'-CO), 169.0 ppm (Gly-CO), 168.8 ppm (3-CO), 164.4 ppm (5'-CO), 164.0 ppm (5-CO), 109.1 ppm (Isopr.-quart.), 108.9 (Isopr.-quart.), 85.8 ppm (8a'-C), 75.3 ppm (8-C), 74.7 ppm (7'-C), 74.4 ppm (7-C), 74.3 ppm (8'-C), 69.5 ppm (2'-C), 62.4 ppm (3-C), 61.2 ppm (6-C), 60.6 ppm (8a-C), 57.2 ppm (3'-C), 54.4 ppm (6'-C), 51.8 ppm (OCH₃), 42.1 ppm (α -C), 40.7 ppm (α' -C), 32.1 ppm (2-C), 26.2 ppm (Isopr.-CH₃), 26.1 ppm (Isopr.-CH₃), 24.0 ppm (Isopr.-CH₃), 23.9 ppm (Isopr.-CH₃).

HRMS (ESI): für C₂₇H₄₀N₉O₁₂S₁⁺ (M+NH₄⁺), ber.: 714.2512, gef.: 714.2512.

CHN-Analyse: ber.: C: 46.55% H: 5.21% N: 16.08%.

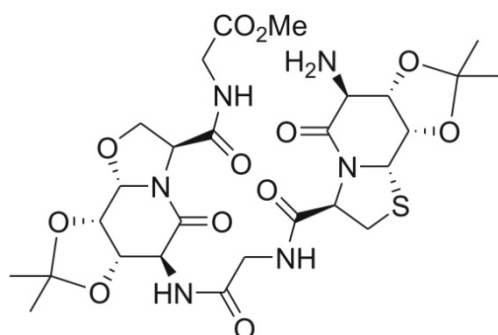
gef.: C: 45.46% H: 5.45% N: 15.60%.

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3309$ w, 2988 w, 2937 w, 2109 m, 1747 m, 1656 s, 1529 m, 1413 m, 1376 m, 1208 s, 1060 m.

Drehwert: $[\alpha]_D^{16.0} = -159.3$, $[\alpha]_{578}^{16.0} = -166.8$, $[\alpha]_{546}^{16.0} = -192.0$, $[\alpha]_{436}^{16.0} = -351.3$, $[\alpha]_{365}^{16.0} = -593.0$,

(*c* = 1.107 g/100 mL, MeOH).

(6S)-amino-Pli^P=Cat-Gly-Pli^P=Cat^O-Gly-OMe (44)



C₂₇H₃₈N₆O₁₂S [670.69]

300 mg (0.43 mmol) der Verbindung **(43)** wurden in 10.0 mL MeOH/DCM 1:1 gelöst und mit 80.0 mg Palladium auf Aktivkohle (10%ig) versetzt. Der Ansatz wurde für vier Tage unter einer Wasserstoffatmosphäre von 1 bar gerührt. Zum Abtrennen des Katalysators wurde über Kieselgur filtriert, das Filtrat eingengt und am Hochvakuum getrocknet. Es wurden 270 mg (0.40 mmol, 95%) der Verbindung **(44)** als farbloser, kristalliner Feststoff erhalten.

Schmp.: 145.0 °C.

¹H-NMR: (600 MHz, DMSO_{d6}); δ = 8.37 ppm (t, $^3J_{\text{Gly}'\text{-NH},\alpha\text{-H}}$ = 5.9 Hz, 1 H, Gly'-NH), 8.15 ppm (d, $^3J_{6'\text{-NH},6'\text{-H}}$ = 6.6 Hz, 1 H, 6'-NH), 7.92 ppm (t, $^3J_{\text{Gly-NH},\alpha\text{-H}}$ = 5.5 Hz, 1 H, Gly-NH), 5.57 ppm (d, $^3J_{8a'\text{-H},8'\text{-H}}$ = 2.0 Hz, 1 H, 8a'-H), 5.51 ppm (d, $^3J_{8a\text{-H},8\text{-H}}$ = 2.1 Hz, 1 H, 8a-H), 5.02 ppm (dd, $^3J_{3\text{-H},2\text{-H}}^{\text{proR}}$ = 5.3 Hz, $^3J_{3\text{-H},2\text{-H}}^{\text{proS}}$ = 2.8 Hz, 1 H, 3-H), 4.67 ppm (dd, $^3J_{8'\text{-H},7'\text{-H}}$ = 7.0 Hz, $^3J_{8'\text{-H},8a'\text{-H}}$ = 2.1 Hz, 1 H, 8'-H), 4.58 ppm (dd, $^3J_{3'\text{-H},2'\text{-H}}^{\text{proR}}$ = 7.2 Hz, $^3J_{3'\text{-H},2'\text{-H}}^{\text{proS}}$ = 3.2 Hz, 1 H, 3'-H), 4.50 ppm (dd, $^3J_{8\text{-H},7\text{-H}}$ = 7.2 Hz, $^3J_{8\text{-H},8a\text{-H}}$ = 2.2 Hz, 1 H, 8-H), 4.43 ppm (dd, $^3J_{7'\text{-H},8'\text{-H}}$ = 7.0 Hz, $^3J_{7'\text{-H},6'\text{-H}}$ = 1.8 Hz, 1 H, 7'-H), 4.33 ppm (dd, $^3J_{7\text{-H},8\text{-H}}$ = 7.2 Hz, $^3J_{7\text{-H},6\text{-H}}$ = 2.2 Hz, 1 H, 7-H), 4.25 ppm (dd, $^2J_{2'\text{-H}}^{\text{proR}}, ^2J_{2'\text{-H}}^{\text{proS}}$ = 8.2 Hz, $^3J_{2'\text{-H},3'\text{-H}}^{\text{proR}}$ = 7.2 Hz, 1 H, 2'-H^{proR}), 4.23 ppm (d, $^3J_{6'\text{-H},6'\text{-NH}}$ = 6.6 Hz, $^3J_{6'\text{-H},7'\text{-H}}$ = 1.8 Hz, 1 H, 6'-H), 4.02 ppm (dd, $^2J_{2'\text{-H}}^{\text{proS}}, ^2J_{2'\text{-H}}^{\text{proR}}$ = 8.1 Hz, $^3J_{2'\text{-H},3'\text{-H}}^{\text{proS}}$ = 3.2 Hz, 1 H, 2'-H^{proS}), 3.88-3.85 ppm (m, 2H, α' -H), 3.84 ppm (dd, $^2J_{\alpha\text{-H},\alpha\text{-H}}$ = 16.7 Hz, $^3J_{\alpha\text{-H},\text{Gly-NH}}$ = 6.0 Hz, 1 H, α^{T} -H), 3.74 ppm (dd, $^2J_{\alpha\text{-H},\alpha\text{-H}}$ = 16.7 Hz, $^3J_{\alpha\text{-H},\text{Gly-NH}}$ = 5.4 Hz, 1 H, α^{H} -H), 3.63 ppm (s, 3 H, OMe), 3.50 ppm (d, $^3J_{6\text{-H},7\text{-H}}$ = 2.2 Hz, 1 H, 6-H), 3.11-3.07 ppm (m, 2H, 2-H), 2.24 ppm (bs, 2H, NH₂), 1.27 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃), 1.26 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃), 1.25 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃), 1.24 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃).

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO_{d6}); δ = 170.2 ppm (Gly'-CO₂Me), 169.8 ppm (3'-CO), 169.5 ppm (3-CO), 169.4 ppm (5-CO), 169.0 ppm (Gly-CO), 164.5 ppm (5'-CO), 109.1 ppm (Isopr._{quart.}), 108.0 ppm (Isopr._{quart.}), 85.8 ppm (8a'-C), 85.8 ppm (8a-C), 77.1 ppm (7-C), 76.2 ppm (8-C), 74.6 ppm (7'-C), 74.4 ppm (8'-C), 69.6 ppm (2'-C), 62.9 ppm (3-C), 60.4 ppm (8a-C), 57.4 ppm (3'-C), 56.1 ppm (6-C), 54.4 ppm (6'-C), 51.7 ppm (OCH₃), 42.2 ppm (α -C), 40.7 ppm (α' -C), 31.2 ppm (2-C), 26.2 ppm (2x Isopr.-CH₃), 24.0 ppm (Isopr.-CH₃), 23.9 ppm (Isopr.-CH₃).

HRMS (ESI): für C₂₇H₃₉N₆O₁₂S⁺ (M+H⁺), ber.: 671.2341, gef.: 671.2344.

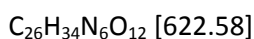
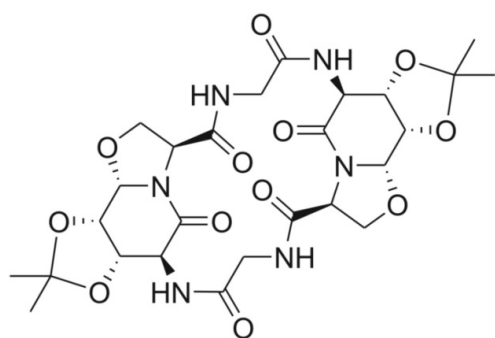
CHN-Analyse: ber.: C: 48.35% H: 5.71% N: 12.53%.

gef.: C: 46.20% H: 5.87% N: 11.79%.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3295 w, 2988 w, 2938 w, 1652 s, 1532 m, 1375 m, 1208 s, 1057 m, 889 w.

Drehwert: $[\alpha]_{\text{D}}^{17.0} = -114.7$, $[\alpha]_{578}^{17.0} = -120.3$, $[\alpha]_{546}^{17.0} = -138.0$, $[\alpha]_{436}^{17.0} = -248.9$,

(c = 1.107 g/100 mL, MeOH).

zyklo-[Pli^P=Cat^O-Gly]₂ (**45**)

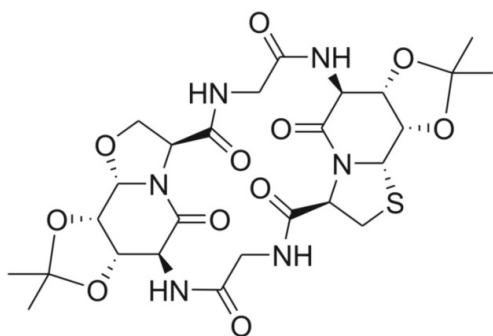
400 mg (0.61 mmol) der Verbindung (**42**) wurden in 5.00 mL 1,4-Dioxan/Wasser gelöst anschließend wurden 0.90 mL (0.90 mmol, 1.5 eq) 1N LiOH zugegeben und bei Raumtemperatur gerührt. Mittels DC-Kontrolle (DCM/MeOH 10:1) wurde der Reaktionsfortschritt kontrolliert. Nach vollständiger Hydrolyse des Esters wurde mit 1N HCl neutralisiert, das Lösungsmittel durch Koevaprieren mit Ethanol/Toluol entfernt und der Ansatz am Hochvakuum getrocknet.

Das offenkettige Hexapeptid wurde in 610 mL DMF gelöst und auf 0 °C herabgekühlt, es wurden 155 mg (1.85 mmol, 3.0 eq) NaHCO₃ und 400 µL (1.85 mmol, 3.0 eq) DPPA zugegeben. Der Ansatz wurde für vier Tage bei 0 °C und einen Tag bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 mL Wasser abgebrochen, anschließend wurde der Ansatz filtriert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in wenig MeOH/DCM 1:1 aufgenommen und in Diethylether gefällt, der Rückstand drei Mal in 5.00 mL Methanol suspendiert und im Ultraschallbad behandelt. Der zurückbleibende Niederschlag wurde abzentrifugiert und darauf mit Diethylether gewaschen; das Produkt wurde zuletzt am Hochvakuum getrocknet. Es konnten 200 mg (0.32 mmol, 52%) des zyklischen Hexapeptids als farbloser Feststoff erhalten werden.

¹H-NMR: (600 MHz, DMSO-d₆); δ = 8.67 ppm (d, ³J_{6-NH,6-H} = 3.7 Hz, 1 H, 6-NH), 7.47 ppm (t, ³J_{Gly-NH,α-H} = 4.3 Hz, 1 H, Gly-NH), 5.40 ppm (d, ³J_{8a-H,8-H} = 2.0 Hz, 1 H, 8a-H), 4.68 ppm (dd, ³J_{3-H,2-H}^{proR} = 6.3 Hz, ³J_{3-H,2-H}^{proS} = 2.4 Hz, 1 H, 3-H), 4.65 ppm (dd, ³J_{8-H,7-H} = 6.6 Hz, ³J_{8-H,8a-H} = 2.2 Hz, 1 H, 8-H), 4.50 ppm (dd, ³J_{7-H,8-H} = 6.6 Hz, ³J_{7-H,6-H} = 2.0 Hz, 1 H, 7-H), 4.15 ppm (dd, ²J_{2-H}^{proS}_{,2-H}^{proR} = 8.0 Hz, ³J_{2-H}^{proS}_{,3-H} = 2.7 Hz, 1 H, 2-H^{proS}), 4.13 ppm (dd, ²J_{2-H}^{proR}_{,2-H}^{proS} = 8.0 Hz, ³J_{2-H}^{proR}_{,3-H} = 6.5 Hz, 1 H, 2-H^{proR}), 3.87 ppm (dd, ²J_{β-H,β-H} = 16.7 Hz, ³J_{α-H,Gly-NH} = 4.7 Hz, 1 H, α^T-H), 3.85-3.84 ppm (m, 1H, 6-H) 3.83 ppm (dd, ²J_{β-H,β-H} = 16.7 Hz, ³J_{α-H,Gly-NH} = 4.2 Hz, 1 H, αH-H), 1.28 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃), 1.27 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃).

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO-d₆); δ = 168.7 ppm (Gly-CO), 168.2 ppm (3-CO), 165.0 ppm (5-CO), 109.4 ppm (Isopr.-quart.), 85.3 ppm (8a-C), 74.7 ppm (7-C), 74.6 ppm (8-C), 68.8 ppm (2-C), 57.2 ppm (3-C), 55.9 ppm (6-C), 42.3 ppm (α-C), 26.4 ppm (Isopr.-CH₃), 24.2 ppm (Isopr.-CH₃).

HRMS (ESI): für C₂₆H₃₄N₆O₁₂Na⁺ (M+Na⁺), ber.: 645.2127, gef.: 645.2126.

zyklo-[Pli^P=Cat-Gly-Pli^P=Cat^O-Gly] (**46**)C₂₆H₃₄N₆O₁₁S [638.65]

225 mg (0.34 mmol) der Verbindung (**44**) wurden in 5.00 mL 1,4-Dioxan/Wasser gelöst anschließend wurden 0.50 mL (0.50 mmol, 1.5 eq) 1N LiOH zugegeben und bei Raumtemperatur gerührt. Mittels DC-Kontrolle (DCM/MeOH 10:1) wurde der Reaktionsfortschritt kontrolliert. Nach vollständiger Hydrolyse des Esters wurde mit 1N HCl neutralisiert, das Lösungsmittel durch Koevaprieren mit Ethanol/Toluol entfernt und der Ansatz am Hochvakuum getrocknet.

Das offenkettige Hexapeptid wurde in 320 mL DMF gelöst und auf 0 °C herabgekühlt, es wurden 85.0 mg (1.30 mmol, 3.0 eq) NaHCO₃ und 215 µL (1.30 mmol, 3.0 eq) DPPA zugegeben. Der Ansatz wurde für vier Tage bei 0 °C und einen Tag bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 mL Wasser abgebrochen, anschließend wurde der Ansatz filtriert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in wenig MeOH/DCM 1:1 aufgenommen und in Diethylether gefällt und anschließend flashchromatographisch aufgereinigt, (DCM/MeOH 10:1). Das Produkt wurde darauf erneut in wenig MeOH/DCM 1:1 aufgenommen und es wurden 200 µL TFA zugegeben. Es wurde in Diethylether ausgefällt und abzentrifugiert, dieses Vorgehen wurde noch zwei Mal wiederholt. Insgesamt wurden 40 mg (0.06 mmol, 18%) der Verbindung **BE00x** als farbloser Feststoff erhalten.

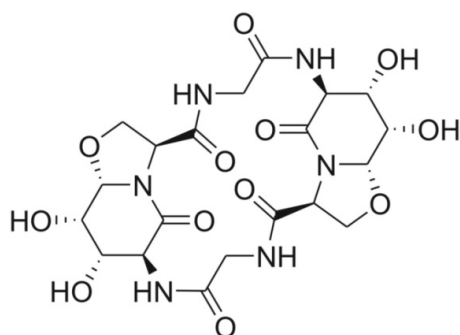
¹H-NMR: (600 MHz, DMSO-d₆); δ = 9.09 ppm (d, ³J_{6-NH,6'-H} = 6.0 Hz, 1 H, 6-NH), 8.91 ppm (d, ³J_{6'-NH,6''-H} = 6.2 Hz, 1 H, 6'-NH), 8.24 ppm (t, ³J_{Gly-NH,α-H} = 3.9 Hz, 1 H, Gly-NH), 8.23 ppm (t, ³J_{Gly-NH,α-H} = 4.0 Hz, 1 H, Gly-NH), 5.74 ppm (d, ³J_{8a'-H,8'-H} = 2.1 Hz, 1 H, 8a'-H), 5.39 ppm (d, ³J_{8a-H,8-H} = 2.0 Hz, 1 H, 8a-H), 5.01 ppm (d, ³J_{3-H,2'-H}^{proR} = 7.0 Hz, 1 H, 3-H), 4.70 ppm (dd, ³J_{8'-H,7'-H} = 6.9 Hz, ³J_{8'-H,8a'-H} = 2.2 Hz, 1 H, 8'-H), 4.59 ppm (dd, ³J_{3'-H,2'-H}^{proR} = 7.2 Hz, ³J_{3'-H,2'-H}^{proS} = 1.9 Hz, 1 H, 3'-H), 4.56 ppm (dd, ³J_{8-H,7-H} = 7.1 Hz, ³J_{8-H,8a-H} = 2.0 Hz, 1 H, 8-H), 4.47 ppm (dd, ³J_{7-H,8-H} = 7.0 Hz, ³J_{7-H,6-H} = 2.0 Hz, 1 H, 7-H), 4.46 ppm (dd, ³J_{7'-H,8'-H} = 6.9 Hz, ³J_{7'-H,6'-H} = 1.9 Hz, 1 H, 7'-H), 4.22 ppm (dd, ²J_{2'-H}^{proR},^{2'-H^{proS} = 8.2 Hz, ³J_{2'-H}^{proR},^{3'-H} = 7.3 Hz, 1 H, 2'-H^{proR}), 4.10 ppm (dd, ²J_{α-H,α-H} = 15.1 Hz, ³J_{α-H,Gly-NH} = 8.6 Hz, 1 H, α^T-H), 4.09 ppm (dd, ²J_{α-H,α-H} = 15.1 Hz, ³J_{α-H,Gly-NH} = 8.5 Hz, 1 H, α^H-H), 4.06-4.00 ppm (m, 3H, 6-H, 6'-H, 2'^{proS}-H), 3.63 ppm (dd, ²J_{α-H,α-H} = 15.5 Hz, ³J_{β-H,Gly-NH} = 4.2 Hz, 1 H, α^T-H), 3.61 ppm (dd, ²J_{α-H,α-H} = 15.4 Hz, ³J_{α-H,Gly-NH} = 4.3 Hz, 1 H, α^H-H), 3.16 ppm (dd,}

$^2J_{2-H^{proR},2-H^{proS}} = 11.3 \text{ Hz}$, $^3J_{2-H^{proR},3-H} = 7.0 \text{ Hz}$, 1 H, 2-H^{proR}), 3.04 ppm (d, $^2J_{2-H^{proS},2-H^{proR}} = 11.3 \text{ Hz}$, 1 H, 2-H^{proS}), 1.28-1.24 ppm (m, 12 H, Isopr.-CH₃).

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO_{d6}); $\delta = 168.7\text{-}168.5 \text{ ppm}$ (3-CO/3'-CO/Gly-CO/Gly'-CO), 165.5 ppm (5-CO), 164.9 ppm (5'-CO), 109.1 ppm (Isopr._{quart.}), 108.4 ppm (Isopr._{quart.}), 86.1 ppm (8a'-C), 76.5 ppm (8-C), 74.8 ppm (7-C/7'-C/8'-C), 74.7 ppm (7-C/7'-C/8'-C), 74.2 ppm (7-C/7'-C/8'-C), 69.6 ppm (2'-C), 64.2 ppm (3-C), 60.9 ppm (8a-C), 58.1 ppm (3'-C), 54.9 ppm (6-C/6'-C), 54.4 ppm (6-C/6'-C), 43.0 ppm (α -C/(α' -C), 42.9 ppm (α -C/(α' -C), 31.8 ppm (2-C), 26.3 ppm (Isopr.-CH₃), 26.2 ppm (Isopr.-CH₃), 23.9 ppm (Isopr.-CH₃), 23.9 ppm (Isopr.-CH₃).

HRMS (ESI): für C₂₆H₃₄N₆O₁₁SN⁺ (M+Na⁺), ber.: 661.1898, gef.: 611.1894.

zyklo-[Pli=Cat⁰-Gly]₂ (47)



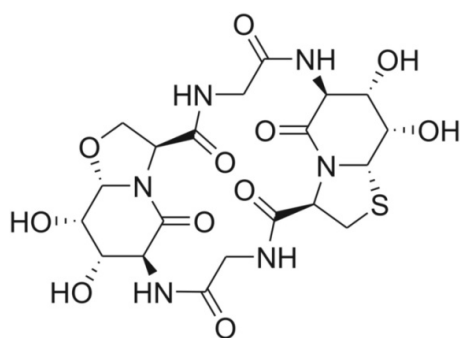
C₂₀H₂₆N₆O₁₂ [542.45]

20 mg (0.03 mmol) der Verbindung **(45)** wurden in 1.00 mL TFA/Wasser 95:5 gelöst, nach zwei Stunden bei Raumtemperatur wurde das Zyklopeptid in Diethylether/Pentan 1:1 ausgefällt. Das Peptid wurde abzentrifugiert und noch drei Mal mit Diethylether gewaschen. Anschließend wurde der farblose Niederschlag am Hochvakuum getrocknet. Es wurden 16 mg (0.03 mmol, 99%) des gewünschten Produkts erhalten.

¹H-NMR: (600 MHz, DMSO_{d6}); $\delta = 9.11 \text{ ppm}$ (d, $^3J_{6-NH,6-H} = 6.6 \text{ Hz}$, 1 H, 6-NH), 7.46 ppm (t, $^3J_{Gly-NH,\alpha-H} = 3.6 \text{ Hz}$, 1 H, Gly-NH), 5.39 ppm (bs, 2H, 2xOH), 4.96 ppm (d, $^3J_{8a-H,8-H} = 1.9 \text{ Hz}$, 1 H, 8a-H), 4.47 ppm (dd, $^3J_{3-H,2-H^{proR}} = 8.0 \text{ Hz}$, $^3J_{3-H,2-H^{proR}} = 6.6 \text{ Hz}$, 1 H, 3-H), 4.36 ppm (t, $^3J_{2-H^{proR},3-H} = 8.3 \text{ Hz}$, 1 H, 2-H^{proR}), 4.05 ppm (d, $^3J_{8-H,7-H} = 1.9 \text{ Hz}$, 1 H, 8-H), 3.84 ppm (dd, $^2J_{\alpha-H,\alpha-H} = 18.0 \text{ Hz}$, $^3J_{\alpha-H,Gly-NH} = 3.8 \text{ Hz}$, 1 H, α^T -H), 3.82 ppm (dd, $^2J_{2-H^{proS},2-H^{proR}} = 8.6 \text{ Hz}$, $^3J_{2-H^{proS},3-H} = 6.8 \text{ Hz}$, 1 H, 2-H^{proS}), 3.75 ppm (dd, $^2J_{\alpha-H,\alpha-H} = 18.0 \text{ Hz}$, $^3J_{\alpha-H,Gly-NH} = 4.0 \text{ Hz}$, 1 H, α^H -H), 3.33 ppm (1H, 6-H unter Wasser-Signal)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO_{d6}); $\delta = 168.7 \text{ ppm}$ (3-CO), 167.5 ppm (Gly-CO), 167.2 ppm (5-CO), 87.5 ppm (8a-c), 68.4 ppm (8-C/2-C), 67.4 ppm (7-C), 57.5 ppm (3-C), 55.8 ppm (6-C), 42.5 ppm (α -C).

HRMS (ESI): für C₂₀H₂₆N₆O₁₂Na⁺ (M+Na⁺), ber.: 565.1501, gef.: 565.1498.

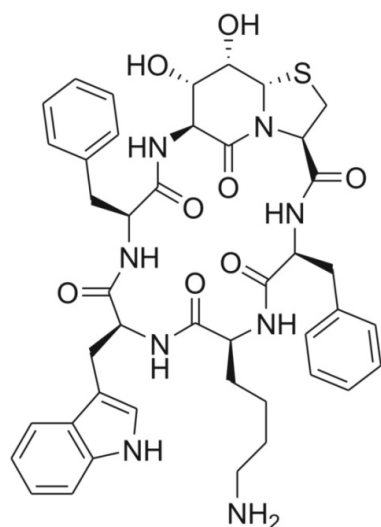
zyklo-[Pli=Cat-Gly-Pli=Cat⁰-Gly] (**48**)C₂₀H₂₆N₆O₁₁S [558.52]

20 mg (0.03 mmol) der Verbindung (**46**) wurden in 1.00 mL TFA/Wasser 95:5 gelöst, nach zwei Stunden bei Raumtemperatur wurde das Zyklopeptid in Diethylether/Pentan ausgefällt. Das Peptid wurde abzentrifugiert und noch drei Mal mit Diethylether gewaschen. Anschließend wurde der farblose Niederschlag am Hochvakuum getrocknet. Es wurden 17 mg (0.03 mmol, 99%) des gewünschten Produkts erhalten.

¹H-NMR: (600 MHz, DMSO_{d6}); δ = 9.24 ppm (d, $^3J_{6\text{-NH},6\text{-H}}$ = 6.7 Hz, 1 H, 6-NH), 9.13 ppm (d, $^3J_{6\text{-NH},6\text{-H}}$ = 6.2 Hz, 1 H, 6-NH), 7.47 ppm (t, $^3J_{\text{Gly-NH},\alpha\text{-H}}$ = 3.6 Hz, 1 H, Gly-NH), 7.46 ppm (t, $^3J_{\text{Gly-NH},\alpha\text{-H}}$ = 3.7 Hz, 1 H, Gly-NH), 5.52 ppm (bs, 1H, OH), 5.40 ppm (bs, 1H, OH), 5.36 ppm (bs, 2H, OH), 5.11 ppm (dd, $^3J_{3\text{-H},2\text{-H}}^{\text{proR}}$ = 6.4 Hz, $^3J_{3\text{-H},2\text{-H}}^{\text{proS}}$ = 2.3 Hz, 1 H, 3-H), 4.97 ppm (d, $^3J_{8\text{a-H},8\text{-H}}$ = 1.4 Hz, 1 H, 8a-H), 4.96 ppm (d, $^3J_{8\text{a}'\text{-H},8'\text{-H}}$ = 1.9 Hz, 1 H, 8a'-H), 4.47 ppm (dd, $^3J_{3'\text{-H},2'\text{-H}}^{\text{proR}}$ = 8.0 Hz, $^3J_{3'\text{-H},2'\text{-H}}^{\text{proS}}$ = 6.8 Hz, 1 H, 3'-H), 4.34 ppm (d, $^3J_{2'\text{-H}}^{\text{proR}}$, $^3J_{3'\text{-H}}$ = 8.2 Hz, 1 H, 2'-H^{proR}), 4.07-4.02 ppm (m, 2H, 7-H/8'-H), 3.93-3.81 ppm (m, 5H, 2'-H^{proS}/α-H, 7'-H/8-H), 3.76 ppm (dd, $^2J_{\alpha\text{-H},\alpha\text{-H}}$ = 17.8 Hz, $^3J_{\alpha\text{-H},\text{Gly-NH}}$ = 3.6 Hz, 1 H, α^T-H), 3.73 ppm (dd, $^2J_{\alpha\text{-H},\alpha\text{-H}}$ = 17.7 Hz, $^3J_{\alpha\text{-H},\text{Gly-NH}}$ = 3.7 Hz, 1 H, α^H-H), 3.40-3.35 ppm (m, 2H, 6-H/6'-H), 3.19 ppm (d, $^2J_{2\text{-H}}^{\text{proS}}$, $^2J_{2\text{-H}}^{\text{proR}}$ = 10.7 Hz, $^3J_{2\text{-H}}^{\text{proS}}$, $^3J_{3\text{-H}}$ = 2.3 Hz, 1 H, 2-H^{proS}), 2.98 ppm (dd, $^2J_{2\text{-H}}^{\text{proR}}$, $^2J_{2\text{-H}}^{\text{proS}}$ = 10.7 Hz, $^3J_{2\text{-H}}^{\text{proR}}$, $^3J_{3\text{-H}}$ = 6.6 Hz, 1 H, 2-H^{proR}).

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO_{d6}); δ = 168.7-168.6 ppm (2x CO), 167.6 ppm (2x CO), 167.5 ppm (CO), 167.3 ppm (CO), 87.5 ppm (8a'-C), 70.4 ppm (7-C/8-C), 70.3 ppm (7-C/8-C), 68.4 ppm (7-C/8'-C), 68.3 ppm (2'-C), 67.3 ppm (7-C/8'-C), 63.3 ppm (3-C), 63.2 ppm (8a-C), 57.5 ppm (3'-C), 56.2 ppm (6-C/6'-C), 55.8 ppm (6-C/6'-C), 43.1 ppm (α-C/(α'-C)), 42.4 ppm (α-C/(α'-C)), 30.5 ppm (2-C).

HRMS (ESI): für C₂₀H₂₇N₆O₁₁S⁺ (M+H⁺), ber.: 559.145, gef.: 559.1456.

zyklo-[Pli=Cat-Phe-Trp-Lys-Phe] (49)

Der lineare Vorläufer der Verbindung wurde mittels Festphasensynthese in 0.1 millimolarem Maßstab entsprechend dem **Festphasenprotokoll II** dargestellt. Die Abspaltung vom Harz erfolgte mit DCM/TFE/HOAc 7:2:1 über einen Zeitraum von 90 Minuten. Das Peptid wurde in Diethylether gefällt, abzentrifugiert und anschließend zwei Mal mit Ether gewaschen. Das offenkettige Hexapeptid wurde in 100 mL DMF gelöst und auf 4 °C herabgekühlt, es wurden 25.0 mg (0.30 mmol, 3.0 eq) NaHCO_3 und 65.0 μL (0.30 mmol, 3.0 eq) DPPA zugegeben. Der Ansatz wurde für fünf Tage bei 4 °C und einen Tag bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 mL Wasser abgebrochen, anschließend wurde der Ansatz filtriert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in wenig MeOH/DCM 1:1 aufgenommen und in Diethylether/Pentan gefällt, dieser Schritt wurde zwei Mal wiederholt. Der am Hochvakuum getrocknete Rückstand wurde flashchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 10:1; $R_f = 0.28$). 60.0 mg des geschützten Peptids wurden in 0.80 mL TFA/Wasser 10:1 gelöst, nach einer Stunde bei Raumtemperatur wurde das Zyklopeptid in Diethylether ausgefällt. Das Peptid wurde abzentrifugiert und noch drei Mal mit Diethylether gewaschen. Der Rückstand wurde mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt, nach anschließender Lyophilisierung konnten 20 mg (0.02 mmol, 20%) **(49)** als farbloser Rückstand erhalten werden.

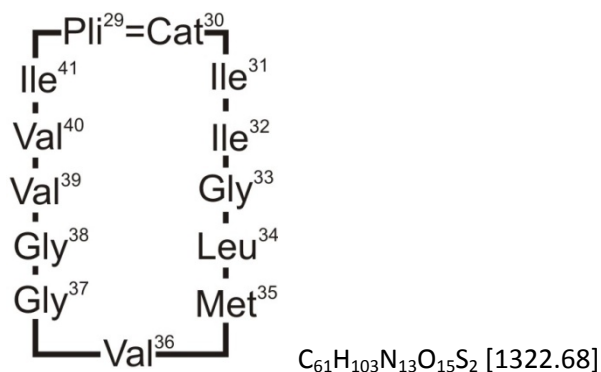
$^1\text{H-NMR}$: (600 MHz, DMSO-d_6); $\delta = 10.88$ ppm (d, $^3J_{\text{Ind-NH,Ind-2H}} = 2.4$ Hz, 1 H, Ind-NH), 9.59 ppm (d, $^3J_{6\text{-NH,6-H}} = 6.9$ Hz, 1 H, 6-NH), 7.93 ppm (d, $^3J_{\text{Lys-NH,Lys-}\beta\text{-H}} = 8.2$ Hz, 1 H, Lys-NH), 7.84 ppm (d, $^3J_{\text{Trp-NH,Trp}\alpha\text{-H}} = 4.8$ Hz, 1 H, Trp-NH), 7.65 ppm (d, $^3J_{\text{Phe}^{\text{A}}\text{-NH,Phe}^{\text{A}}\alpha\text{-H}} = 9.8$ Hz, 1 H, $\text{Phe}^{\text{A}}\text{-NH}$), 7.62 ppm (bs, 3 H, Lys-NH_3^+), 7.51 ppm (d, $^3J_{\text{Ind-H,Ind-H}} = 8.1$ Hz, 1 H, Ind-H), 7.37 ppm (d, $^3J_{\text{Ind-H,Ind-H}} = 8.3$ Hz, 1 H, Ind-H), 7.32 ppm (dd, $^3J_{\text{Phe}^{\text{A}}\text{-H,Phe}^{\text{A}}\text{-H}} = 8.4$ Hz, $^3J_{\text{Phe}^{\text{A}}\text{-H,Phe}^{\text{A}}\text{-H}} = 7.2$ Hz, 1 H, $\text{Phe}^{\text{A}}\text{-H}$), 7.22-7.18 ppm (m, 6 H, Ind-H/ $\text{Phe}^{\text{B}}\text{-H}$), 7.17-7.13 ppm (m, 1 H, $\text{Phe}^{\text{A}}\text{-H}$), 7.10 ppm (dt, $^3J_{\text{Ind-H,Ind-H}} = 7.0$ Hz, $^4J_{\text{Ind-H,Ind-H}} = 1.2$ Hz, 1 H, Ind-H), 7.01 ppm (dt, $^3J_{\text{Ind-H,Ind-H}} = 7.0$ Hz, $^4J_{\text{Ind-H,Ind-H}} = 1.1$ Hz, 1 H, Ind-H), 6.68 ppm (d,

$^3J_{\text{Phe}^{\text{B}}\text{-NH}, \text{Phe}^{\text{B}}\text{-}\alpha\text{-H}} = 6.2 \text{ Hz}$, 1 H, $\text{Phe}^{\text{B}}\text{-NH}$), 6.83 ppm (dd, $^3J_{\text{Phe}^{\text{A}}\text{-H}, \text{Phe}^{\text{A}}\text{-H}} = 8.6 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{Phe}^{\text{A}}\text{-H}, \text{Phe}^{\text{A}}\text{-H}} = 6.9 \text{ Hz}$, 1 H, $\text{Phe}^{\text{A}}\text{-H}$), 5.41 ppm (bs, 1 H, 8-OH), 5.39 ppm (bs, 1 H, 7-OH), 5.03 ppm (dd, $^3J_{3\text{-H}, 2\text{-H}^{\text{proR}}} = 6.8 \text{ Hz}$, $^3J_{3\text{-H}, 2\text{-H}^{\text{proS}}} = 2.1 \text{ Hz}$, 1 H, 3-H), 4.68 ppm (ddd, $^3J_{\text{Phe}^{\text{A}}\text{-}\alpha, \text{Phe}^{\text{A}}\text{-}\beta} = 12.0 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{Phe}^{\text{A}}\text{-}\alpha, \text{Phe}^{\text{A}}\text{-NH}} = 9.8 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{Phe}^{\text{A}}\text{-}\alpha, \text{Phe}^{\text{A}}\text{-}\beta} = 5.7 \text{ Hz}$, 1 H, $\text{Phe}^{\text{A}}\text{-}\alpha\text{-H}$), 4.57 ppm (dd, $^3J_{\text{Phe}^{\text{A}}\text{-}\alpha, \text{Phe}^{\text{A}}\text{-}\beta} = 11.0 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{Phe}^{\text{A}}\text{-}\alpha, \text{Phe}^{\text{A}}\text{-}\beta} = 4.9 \text{ Hz}$, 1 H, $\text{Phe}^{\text{A}}\text{-}\alpha\text{-H}$), 4.27-4.22 ppm (m, 1 H, $\text{Trp}\text{-}\alpha\text{-H}$), 4.08 ppm (ddd, $^3J_{\text{Lys}\text{-}\alpha, \text{Lys}\text{-}\beta} = 10.1 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{Lys}\text{-}\alpha, \text{Lys}\text{-NH}} = 8.2 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{Lys}\text{-}\alpha, \text{Lys}\text{-}\beta} = 4.9 \text{ Hz}$, 1 H, $\text{Lys}\text{-}\alpha\text{-H}$), 3.79 ppm (d, $^3J_{7\text{-H}, 6\text{-H}} = 9.4 \text{ Hz}$, 1 H, 7-H), 3.68 ppm (d, $^3J_{8\text{a-H}, 8\text{-H}} = 1.5 \text{ Hz}$, 1 H, 8a-H), 3.64 ppm (s, 1 H, 8-H), 3.42 ppm (dd, $^3J_{6\text{-H}, 7\text{-H}} = 9.3 \text{ Hz}$, $^3J_{6\text{-H}, 6\text{-NH}} = 6.7 \text{ Hz}$, 1 H, 6-NH), 3.41-3.39 ppm (m, 1 H, $\text{Phe}^{\text{A}}\text{-}\beta\text{-H}$), 3.26 ppm (dd, $^2J_{\text{Phe}^{\text{B}}\text{-}\beta, \text{Phe}^{\text{B}}\text{-}\beta} = 13.7 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{Phe}^{\text{B}}\text{-}\beta, \text{Phe}^{\text{B}}\text{-}\alpha} = 5.2 \text{ Hz}$, 1 H, $\text{Phe}^{\text{B}}\text{-}\beta\text{-H}$), 3.16 ppm (dd, $^2J_{\text{Trp}\text{-}\beta, \text{Trp}\text{-}\beta} = 15.1 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{Trp}\text{-}\beta, \text{Trp}\text{-}\alpha} = 8.4 \text{ Hz}$, 1 H, $\text{Trp}\text{-}\beta\text{-H}$), 3.11 ppm (dd, $^2J_{\text{Trp}\text{-}\beta, \text{Trp}\text{-}\beta} = 15.1 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{Trp}\text{-}\beta, \text{Trp}\text{-}\alpha} = 6.3 \text{ Hz}$, 1 H, $\text{Trp}\text{-}\beta\text{-H}$), 2.93 ppm (dd, $^2J_{\text{Phe}^{\text{B}}\text{-}\beta, \text{Phe}^{\text{B}}\text{-}\beta} = 13.6 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{Phe}^{\text{B}}\text{-}\beta, \text{Phe}^{\text{B}}\text{-}\alpha} = 4.8 \text{ Hz}$, 1 H, $\text{Phe}^{\text{B}}\text{-}\beta\text{-H}$), 2.89 ppm (dd, $^2J_{2\text{-H}^{\text{proS}}, 2\text{-H}^{\text{proR}}} = 10.4 \text{ Hz}$, $^3J_{2\text{-H}^{\text{proS}}, 3\text{-H}} = 2.1 \text{ Hz}$, 1 H, 2-H^{proS}), 2.78 ppm (dd, $^2J_{2\text{-H}^{\text{proR}}, 2\text{-H}^{\text{proS}}} = 10.4 \text{ Hz}$, $^3J_{2\text{-H}^{\text{proR}}, 3\text{-H}} = 6.8 \text{ Hz}$, 1 H, 2-H^{proR}), 2.75-2.66 ppm (m, 3 H, $\text{Phe}^{\text{A}}\text{-}\beta\text{-H}/\text{Lys}\text{-}\epsilon\text{-H}$), 1.79-1.71 ppm (m, 1 H, $\text{Lys}\text{-}\beta\text{-H}$), 1.62-1.54 ppm (m, 1 H, $\text{Lys}\text{-}\beta\text{-H}$), 1.52-1.45 ppm (m, 2 H, $\text{Lys}\text{-}\delta\text{-H}$), 1.30-1.21 ppm (m, 1 H, $\text{Lys}\text{-}\gamma\text{-H}$), 1.20-1.11 ppm (m, 1 H, $\text{Lys}\text{-}\gamma\text{-H}$).

$^{13}\text{C-NMR}$: (125 MHz, DMSO-d_6); $\delta = 172.6 \text{ ppm}$ (Trp-CO), 171.3 ppm (Lys-CO), 170.5 ppm ($\text{Phe}^{\text{A}}\text{-CO}$), 170.4 ppm ($\text{Phe}^{\text{B}}\text{-CO}$), 167.6 ppm (3-CO), 165.3 ppm (5-CO), 137.9 ppm ($\text{Phe}^{\text{B}}_{\text{quart.}}$), 136.3 ppm ($\text{Phe}^{\text{A}}_{\text{quart.}}$), 136.2 ppm ($\text{Trp}_{\text{quart.}}$), 129.8 ppm ($\text{Phe}^{\text{B}}\text{-Ar.}$), 129.1 ppm ($\text{Phe}^{\text{A}}\text{-Ar.}$), 128.1 ppm ($\text{Phe}^{\text{B}}\text{-Ar.}$), 128.0 ppm ($\text{Phe}^{\text{A}}\text{-Ar.}$), 127.2 ppm (Trp-Ar.), 126.6 ppm ($\text{Trp}_{\text{quart.}}$), 126.1 ppm (Trp-Ar.), 123.6 ppm ($\text{Phe}^{\text{B}}\text{-Ar.}$), 121.2 ppm (Trp-Ar.), 118.5 ppm (Trp-Ar.), 118.1 ppm (Trp-Ar.), 111.6 ppm (Trp-Ar.), 109.7 ppm ($\text{Trp}_{\text{quart.}}$), 69.9 ppm (7-C), 68.1 ppm (8-C), 62.4 ppm (8a-C), 61.4 ppm (3-C), 57.2 ppm ($\text{Trp}\text{-}\beta$), 55.4 ppm (6-C), 53.5 ppm ($\text{Lys}\text{-}\alpha$), 52.6 ppm ($\text{Phe}^{\text{B}}\text{-}\alpha$), 51.8 ppm ($\text{Phe}^{\text{A}}\text{-}\alpha$), 38.3 ppm ($\text{Lys}\text{-}\epsilon$), 37.9 ppm ($\text{Phe}^{\text{B}}\text{-}\beta$), 36.8 ppm ($\text{Phe}^{\text{A}}\text{-}\beta$), 31.2 ppm ($\text{Lys}\text{-}\beta$), 29.4 ppm (2-C), 26.8 ppm ($\text{Trp}\text{-}\beta$), 26.4 ppm ($\text{Lys}\text{-}\delta$), 22.7 ppm ($\text{Lys}\text{-}\gamma$).

HRMS (ESI): für $\text{C}_{43}\text{H}_{51}\text{N}_8\text{O}_8\text{S}^+$ ($\text{M} + \text{H}^+$), ber.: 839.3545, gef.: 839.3551.

zyklo(Pli^P=Cat^{29,30}-Ile³¹-Ile³²-Gly³³-Leu³⁴-Met³⁵-Val³⁶-Gly³⁷-Gly³⁸-Val³⁹-Val⁴⁰-Ile⁴¹) (50)



Der lineare Vorläufer der Verbindung wurde mittels Festphasensynthese in 0.4 millimolarem Maßstab entsprechend dem **Festphasenprotokoll I** dargestellt. Die Abspaltung vom Harz erfolgte mit DCM/TFE/HOAc 7:2:1 über einen Zeitraum von 90 Minuten. Das Peptid wurde in Diethylether gefällt, abzentrifugiert und anschließend zwei Mal mit Ether gewaschen.

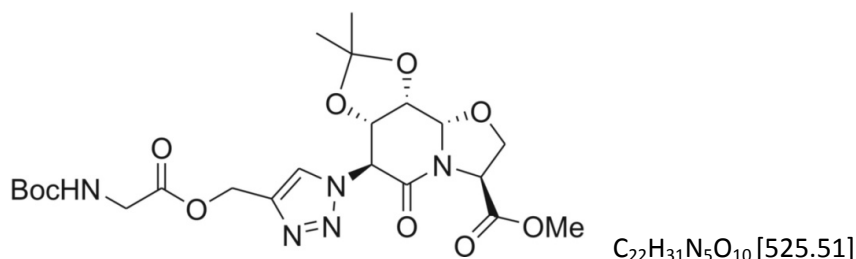
Das 232 mg des offenkettigen Hexapeptids wurde in 20 mL DMF gelöst und auf 4 °C herabgekühlt, es wurden 42.0 mg (0.50 mmol, 3.0 eq) NaHCO₃ und 110 µL (0.50 mmol, 3.0 eq) DPPA zugegeben. Der Ansatz wurde für sieben Tage bei 4 °C gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 mL Wasser abgebrochen, anschließend wurde der Ansatz filtriert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde auf Kieselgel aufgezogen und anschließend flashchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 10:1 → 5:1). Dabei wurden 69 mg der Verbindung als Verunreinigtes Produkt erhalten. Dieser wurde mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt, nach anschließender Lyophilisierung konnten 20 mg (0.02 mmol, 9%) **(50)** als farbloser Rückstand erhalten werden.

¹H-NMR: (600 MHz, DMSO-d₆); δ = 8.34 ppm (d, ³J_{6-NH,6H} = 6.4 Hz, 1 H, 6-NH), 8.27 ppm (d, ³J_{NH,α-H} = 6.0 Hz, 1 H, Gly³⁷-NH), 8.09 ppm (d, ³J_{NH,α-H} = 7.8 Hz, 1 H, Met³⁵-NH), 8.06 ppm (bs, 1 H, Gly³³-NH), 8.00 ppm (d, ³J_{NH,α-H} = 8.7 Hz, 1 H, Ile⁴¹-NH), 7.96 ppm (d, ³J_{NH,α-H} = 5.5 Hz, 1 H, Gly³⁸-NH), 7.91-7.88 ppm (m, 2 H, Val⁴⁰-NH/ Leu³⁴-NH), 7.83-7.79 ppm (m, 2 H, Val³⁹-NH/ Ile³¹-NH), 7.78 ppm (d, ³J_{NH,α-H} = 8.2 Hz, 1 H, Ile³²-NH), 7.67 ppm (bs, 1 H, Val³⁶-NH), 5.22 ppm (d, ³J_{8a-H,8-H} = 1.0 Hz, 1 H, 8a-H), 5.10 ppm (dd, ³J_{3-H,2-H}^{proR} = 5.8 Hz, ³J_{3-H,2-H}^{proS} = 1.8 Hz, 1 H, 3-H), 4.51 ppm (dd, ³J_{8-H,7-H} = 7.0 Hz, ³J_{8-H,8a-H} = 1.1 Hz, 1 H, 8-H), 4.40 ppm (dd, ³J_{7-H,8-H} = 6.9 Hz, ³J_{7-H,6-H} = 2.0 Hz, 1 H, 7-H), 4.34 ppm (bs, 1 H, Met³⁵-α), 4.31-4.26 ppm (m, 1 H, Leu³⁴-α), 4.24-4.10 ppm (m, 6 H, 6-H/Ile³¹-α/Ile³²-α/Val³⁹-α/Val⁴⁰-α/Ile⁴¹-α), 4.07 ppm (t, ³J_{α-H,NH} = 7.0 Hz, 1 H, Val³⁶-α), 3.85 ppm (dd, ²J_{α-H,α-H} = 16.8 Hz, ³J_{β-H,NH} = 6.4 Hz, 1 H, Gly³⁸-α), 3.83-3.81 ppm (m, 1 H, Gly³⁷-α), 3.78 ppm (dd, ²J_{α-H,α-H} = 16.3 Hz, ³J_{α-H,NH} = 5.9 Hz, 1 H, Gly³³-α), 3.73-3.67 ppm (m, 2 H, Gly³³-α/Gly³⁸-α), 3.62 ppm (dd, ²J_{α-H,α-H} = 16.3 Hz, ³J_{α-H,NH} = 5.3 Hz, 1 H, Gly³⁷-α), 3.16-3.08 ppm (m, 2 H, 2-H), 2.45-2.32 ppm (m, 2 H, Met³⁵-β), 2.00 ppm (s, 3 H), 1.99-1.82 ppm (m, 6 H), 1.77-1.69 ppm (m, 2 H), 1.62-1.55 ppm (m, 1 H),

1.51-1.35 ppm (m, 5 H), 1.30-1.25 ppm (m, 6 H, Isopr.-CH₃), 1.12-1.02 ppm (m, 3 H), 0.89-0.74 ppm (m, 44 H).

HRMS (ESI): für C₆₁H₁₀₃N₁₃O₁₅S₂Na⁺ (M + Na⁺), ber.: 1344.7030, gef.: 1344.7022.

Boc-Glycin-1-Pli^P=Cat^O-1H-[1,2,3]triazol-4-ylmethyl ester (51)



50.0 mg (0.16 mmol, 1.0 eq) der Verbindung (**36**) wurden in 5.00 mL 1,4-Dioxan/Wasser gelöst, es erfolgte die Zugabe von 34.0 mg (0.16 mmol, 1.0 eq) Boc-Gly-OPrg. Anschließend wurden 200 mg (1.01 mmol, 6.3 eq) (+)Na-L-Ascorbat in 1 mL Wasser, 20.0 µL (0.23 mmol, 1.4 eq) Morpholin und 160 µL (0.16 mmol, 1.0 eq) einer 1N Cu^{II}SO₄-Lösung zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 2 Minuten im Ultraschallbad behandelt wobei eine trübe, gelblich-grüne Suspension entstand. Nach einer Stunde wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit wenig Wasser aufgenommen. Die wässrige Phase wurde zwei Mal mit je 20 mL Dichlormethan extrahiert, die organische Phase wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde abschließend über 5 cm Silica filtriert und mit Essigsäureethylester eluiert (DCM/EE 1:1; R_f = 0.54). Es wurden 70 mg (0.13 mmol, 81%) der Verbindung (**51**) in Form eines farblosen Pulvers erhalten.

Schmp.: 70.0 °C.

¹H-NMR: (600 MHz, DMSO-d₆); δ = 8.28 ppm (s, 1 H, 5-CH-Triazol), 7.22 ppm (t, ³J_{NH,α-H} = 6.1 Hz, 1 H, Gly-NH), 5.40 ppm (d, ³J_{6-H,7-H} = 1.5 Hz, 1 H, 6-H), 5.29 ppm (d, ³J_{8a-H,8-H} = 2.3 Hz, 1 H, 8a-H), 5.20 ppm (d, ³J_{H,H} = 1.5 Hz, 2 H, CH₂-Triazol), 5.12 ppm (dd, ³J_{7-H,8-H} = 6.9 Hz, ³J_{7-H,6-H} = 1.6 Hz, 1 H, 7-H), 4.92 ppm (dd, ³J_{8-H,7-H} = 6.9 Hz, ³J_{8-H,8a-H} = 2.4 Hz, 1 H, 8-H), 4.87 ppm (dd, ³J_{3-H,2-H^{proR}} = 6.9 Hz, ³J_{3-H,2-H^{proS}} = 3.3 Hz, 1 H, 3-H), 4.28 ppm (dd, ²J_{2-H^{proR},2-H^{proS}} = 8.6 Hz, ³J_{2-H^{proR},3-H} = 7.0 Hz, 1 H, 2-H^{proR}), 4.10 ppm (dd, ²J_{2-H^{proS},2-H^{proR}} = 8.5 Hz, ³J_{2-H^{proS},3-H} = 3.4 Hz, 1 H, 2-H^{proS}), 3.70 ppm (d, ³J_{α-H,NH} = 6.2 Hz, 2 H, α-H), 3.62 ppm (s, 3 H, CO₂CH₃), 1.37 ppm (s, 9H, Boc) 1.36 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃^t), 1.35 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃^h).

¹³C-NMR: (150 MHz, DMSO-d₆); δ = 170.2 ppm (Gly-CO), 169.3 ppm (CO₂CH₃), 160.2 ppm (5-CO), 155.9 ppm (Boc-CO), 142.0 ppm (C4-Triazol), 125.5 ppm (C5-Triazol), 109.5 ppm (Isopr._{quart.}), 85.7 ppm (8a-C), 78.3 ppm (Boc-C_{quart.}), 74.1 ppm (7-C), 73.3 ppm (8-C), 69.0 ppm (2-C), 61.9 ppm (6-C), 57.2 ppm (CH₂-Prg), 56.0 ppm (3-C), 52.6 ppm (CO₂CH₃), 41.8 ppm (α-C), 28.2 ppm (Boc-CH₃), 26.2 ppm (Isopr.-CH₃), 24.0 ppm (Isopr.-CH₃).

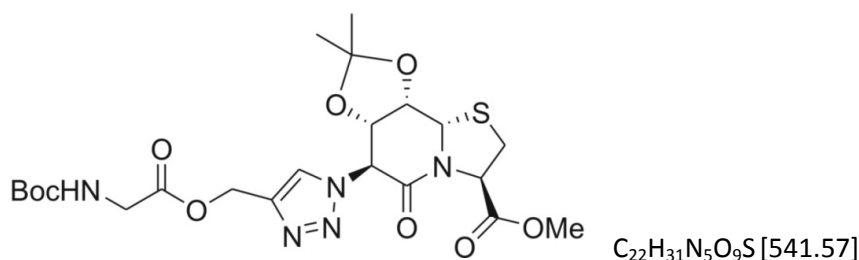
HRMS (ESI): für $C_{22}H_{32}N_5O_{10}^+(M+H^+)$, ber.: 526.2151, gef.: 526.2144.

CHN-Analyse: ber.: C: 50.28% H: 5.95% N: 13.33%
gef.: C: 50.11% H: 6.11% N: 13.36%.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3382 br, 2981 m, 1747 s, 1687 s, 1517 m, 1439 m, 1366 m, 1159 s, 1055 m, 899 m.

Drehwert: $[\alpha]_D^{15.0} = -46.5$, $[\alpha]_{578}^{15.0} = -48.8$, $[\alpha]_{546}^{15.0} = -55.9$, $[\alpha]_{436}^{15.0} = -99.0$, $[\alpha]_{365}^{15.0} = -158.8$,
(c = 1.005 g/100 mL, $CHCl_3$).

Boc-Glycin-1-Pli^P=Cat-1H-[1,2,3]triazol-4-ylmethyl ester (52)



100 mg (0.30 mmol, 1.0 eq) der Verbindung **(5)** wurden in 5.00 mL 1,4-Dioxan/Wasser gelöst, es erfolgte die Zugabe von 65.0 mg (0.30 mmol, 1.0 eq) Boc-Gly-OPrg. Anschließend wurden 400 mg (1.01 mmol, 6.3 eq) (+)Na-L-Ascorbat in 2 mL Wasser, 100 μ L (1.15 mmol, 3.8 eq) Morpholin und 300 μ L (0.30 mmol, 1.0 eq) einer 1N $Cu^{II}SO_4$ -Lösung zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für mehrere Minuten im Ultraschallbad behandelt wobei eine trübe, braune Suspension entstand. Nach einer Stunde wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit wenig Wasser aufgenommen. Die wässrige Phase wurde zwei Mal mit je 20 mL Dichlormethan extrahiert, die organische Phase wurden über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde abschließend über 5 cm Silica filtriert und mit Essigsäureethylester eluiert (DCM/EE 2:1; R_f = 0.40). Es wurden 160 mg (0.29 mmol, 97%) der Verbindung **(52)** in Form eines farblosen Pulvers erhalten.

Schmp.: 79.0 °C.

1H -NMR: (600 MHz, $DMSO-d_6$); δ = 8.27 ppm (s, 1 H, 5-CH-Triazol), 7.22 ppm (t, $^3J_{NH,\alpha-H} = 6.1$ Hz, 1 H, Gly-NH), 5.40 ppm (d, $^3J_{3-H,2-H^{proS}} = 1.8$ Hz, 1 H, 3-H), 5.39 ppm (d, $^3J_{6-H,7-H} = 1.9$ Hz, 1 H, 6-H), 5.26-5.17 ppm (m, 2H, 7-H/ CH_2 -Triazol), 4.97 ppm (d, $^3J_{8a-H,8-H} = 2.2$ Hz, 1 H, 8a-H), 4.74 ppm (dd, $^3J_{8-H,7-H} = 7.0$ Hz, $^3J_{8-H,8a-H} = 2.1$ Hz, 1 H, 8-H), 3.70 ppm (d, $^3J_{\alpha-H,NH} = 6.3$ Hz, 2 H, α -H), 3.62 ppm (s, 3 H, CO_2CH_3), 3.17 ppm (dd, $^2J_{2-H^{proS},2-H^{proR}} = 11.5$ Hz, $^3J_{2-H^{proS},3-H} = 1.8$ Hz, 1 H, 2-H^{proS}), 3.13 ppm (dd, $^2J_{2-H^{proR},2-H^{proS}} = 11.5$ Hz, $^3J_{2-H^{proR},3-H} = 5.9$ Hz, 1 H, 2-H^{proR}), 1.37 ppm (s, 12H, Boc/ Isopr.- CH_3^t) 1.36 ppm (s, 3 H, Isopr.- CH_3^h).

^{13}C -NMR: (150 MHz, $DMSO-d_6$); δ = 170.1 ppm (Gly-CO), 169.2 ppm (CO_2CH_3), 161.7 ppm (5-CO), 155.8 ppm (Boc-CO), 142.0 ppm (C4-Triazol), 125.3 ppm (C5-Triazol), 108.9 ppm (Isopr._{quart.}),

78.3 ppm (Boc-C_{quart.}), 75.1 ppm (8-C), 74.4 ppm (7-C), 61.8 ppm (3-C/6-C), 61.5 ppm (3-C/6-C), 60.2 ppm (8a-C), 57.2 ppm (CH₂-Prg), 52.6 ppm (CO₂CH₃), 41.8 ppm (α-C), 31.2 ppm (2-C), 28.1 ppm (Boc-CH₃), 26.1 ppm (Isopr.-CH₃), 23.9 ppm (Isopr.-CH₃).

HRMS (ESI): für C₂₂H₃₂N₅O₉S⁺ (M+H⁺), ber.: 542.1915, gef.: 542.1920.

CHN-Analyse: ber.: C: 48.79% H: 5.77% N: 12.93%

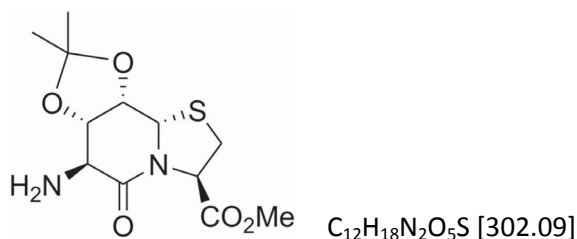
gef.: C: 48.61% H: 5.87% N: 12.88%.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3391 br, 2979 m, 1744 s, 1682 s, 1515 m, 1366 m, 1158 s, 1056 m.

Drehwert: $[\alpha]_{\text{D}}^{15.0} = -50.7$, $[\alpha]_{578}^{15.0} = -53.2$, $[\alpha]_{546}^{15.0} = -60.8$, $[\alpha]_{436}^{15.0} = -106.6$, $[\alpha]_{365}^{15.0} = -167.9$,

(c = 1.005 g/100 mL, CHCl₃).

8a(S)H-(6S)-amino-(7S,8S)-O-isopropyliden-5oxo-hexahydro-thiazolo[3,2-a]pyridin-3(R)-carbonsäure-methylester (53)



4.46 g (13.6 mmol) der Verbindung (**5**) wurden in 50.0 mL Methanol gelöst und mit 0.45 g Palladium auf Aktivkohle (10%ig) versetzt. Der Ansatz wurde für drei Tage unter einer Wasserstoffatmosphäre von 10 bar im Autoklaven gerührt. Zum Abtrennen des Katalysators wurde über Kieselgur filtriert, das Filtrat eingengt und am Hochvakuum getrocknet. Es wurden 4.10 g (13.5 mmol, 99%) der Verbindung (**53**) als schwachgelbes Pulvers erhalten.

Schmp.: 136.5 °C

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO_{d6}); δ = 5.46 ppm (d, $^3J_{8a-H,8-H} = 2.2$ Hz, 1 H, 8a-H), 5.20 ppm (dd, $^3J_{3-H,2-H}^{\text{proR}} = 5.2$ Hz, $^3J_{3-H,2-H}^{\text{proS}} = 2.5$ Hz, 1 H, 3-H), 4.47 ppm (dd, $^3J_{8-H,7-H} = 7.4$ Hz, $^3J_{8-H,8a-H} = 2.2$ Hz, 1 H, 8-H), 4.35 ppm (dd, $^3J_{7-H,8-H} = 7.3$ Hz, $^3J_{7-H,6-H} = 2.3$ Hz, 1 H, 7-H), 3.66 ppm (s, 3 H, CO₂CH₃), 3.49 ppm (d, $^3J_{6-H,7-H} = 2.2$ Hz, 1 H, 6-H), 3.10-3.08 ppm (m, 2 H, 2-H), 2.03 ppm (bs, 2H, 6-NH₂), 1.26 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃^t), 1.24 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃^h).

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO_{d6}); δ = 169.9 ppm (CO₂CH₃), 168.7 ppm (5-CO), 108.0 ppm (Isopr.-quart.), 76.9 ppm (7-C), 75.8 ppm (8-C), 61.1 ppm (3-C), 59.4 (8a-C), 56.0 ppm (6-C), 52.4 ppm (CO₂CH₃), 32.2 ppm (2-C), 26.2 ppm (Isopr.-CH₃), 23.9 ppm (Isopr.-CH₃).

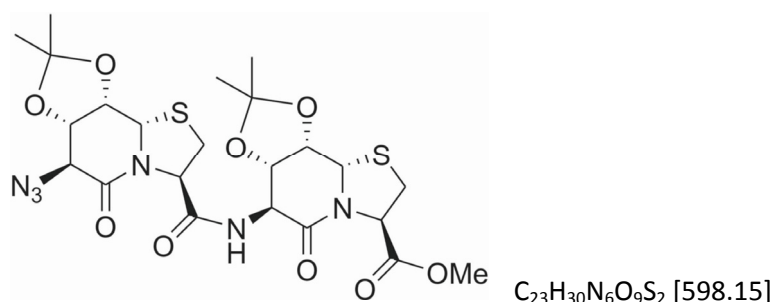
HRMS (ESI): für C₁₂H₁₈N₂O₅SN⁺ (M⁺), ber.: 303.1009, gef.: 303.1014.

CHN-Analyse: ber.: C: 47.67% H: 6.00% N: 9.27%
 gef.: C: 47.34% H: 6.91% N: 8.05%.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3362 m, 3311 w, 2981 m, 2904 m, 1756 s, 1670 s, 1425 m, 1377 m, 1249 w, 1205 s, 1174 m, 1143 w, 1090 w, 1068 m, 881 m.

Drehwert: $[\alpha]_{\text{D}}^{26.0} = -148.5$, $[\alpha]_{578}^{26.0} = -155.5$, $[\alpha]_{546}^{26.0} = -177.8$, $[\alpha]_{436}^{26.0} = -314.5$, $[\alpha]_{365}^{26.0} = -500.8$,
 (c = 1.15 g/100 mL, CHCl₃).

(6S)-azido-Pli^P=Cat-Pli^P=Cat-OMe (54)



1.50 g (4.6 mmol, 1.0 eq) der Verbindung **(5)** wurden in 40.0 mL Methanol gelöst, es erfolgte die Zugabe von 9.3 mL (9.3 mmol, 2.0 eq) 1N LiOH. Durch DC-Kontrolle (DCM/EE 2:1) wurde der Reaktionsfortschritt verfolgt. Nach vollständiger Hydrolyse des Esters wurde mit 1N HCl neutralisiert, das Lösungsmittel entfernt, zwei Mal mit Toluol/Ethanol koevaporiert und der Ansatz am Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde in 50.0 mL DMF aufgenommen, es wurden 1.74 g (4.6 mmol, 1.0 eq) HBTU, 700 mg (4.6 mmol, 1.0 eq) HOBt und 1.38 g (4.6 mmol, 1.0 eq) **(53)** zugegeben. Der pH-Wert wurde durch DIPEA-Zugabe auf pH = 8 eingestellt und der Ansatz für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand in 100 mL Essigsäureethylester aufgenommen und gegen jeweils 50.0 mL Salzsäure (c = 0.5 mol/L), gesättigte NaHCO₃-Lösung sowie gesättigte NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde abschließend säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/EE 2:1; R_f = 0.40). Es wurden 1.21 g (2.02 mmol, 44%) der Verbindung **(54)** in Form eines farblosen Pulvers erhalten.

Schmp.: >230 °C.

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆); δ = 8.44 ppm (d, $^3J_{6^B\text{-NH}, 6^B\text{-H}} = 8.2$ Hz, 1 H, 6^B-NH), 5.29 ppm (dd, $^3J_{3^B\text{-H}, 2^B\text{-H}^{\text{proR}}} = 5.9$ Hz, $^3J_{3^B\text{-H}, 2^B\text{-H}^{\text{proS}}} = 1.7$ Hz, 1 H, 3^B-H), 5.27 ppm (d, $^3J_{8a^B\text{-H}, 8^B\text{-H}} = 2.0$ Hz, 1 H, 8a^B-H), 5.15 ppm (d, $^3J_{8a^A\text{-H}, 8^A\text{-H}} = 1.9$ Hz, 1 H, 8a^A-H), 5.11 ppm (dd, $^3J_{3^A\text{-H}, 2^A\text{-H}^{\text{proR}}} = 6.7$ Hz, $^3J_{3^A\text{-H}, 2^A\text{-H}^{\text{proS}}} = 1.8$ Hz, 1 H, 3^A-H), 4.59-4.57 ppm (m, 1 H, 8^A-H), 4.57-4.55 ppm (m, 1 H, 8²-H), 4.51 ppm (dd, $^3J_{7^A\text{-H}, 8^A\text{-H}} = 7.2$ Hz, $^3J_{7^A\text{-H}, 6^A\text{-H}} = 2.4$ Hz, 1 H, 7^A-H), 4.45 ppm (d, $^3J_{6^A\text{-H}, 7^A\text{-H}} = 2.4$ Hz, 1 H, 6^A-H), 4.44 ppm (dd, $^3J_{7^B\text{-H}, 8^B\text{-H}} = 7.0$ Hz, $^3J_{7^B\text{-H}, 6^B\text{-H}} = 2.1$ Hz, 1 H, 7^B-H), 4.38 ppm (dd, $^3J_{6^B\text{-N}, 6^B\text{-NH}} = 8.2$ Hz, $^3J_{6^B\text{-H}, 7^B\text{-H}} = 2.0$ Hz,

1 H, 6^B-H), 3.68 ppm (s, 3 H, CO₂CH₃), 3.18 ppm (dd, $^2J_{2\text{-H}^{\text{proR}}, 2\text{-H}^{\text{proS}}} = 11.4$ Hz, $^3J_{2\text{-H}^{\text{proR}}, 3\text{-H}} = 6.8$ Hz, 1 H, 2^A-H^{proR}), 3.16 ppm (dd, $^2J_{2\text{-H}^{\text{proS}}, 2\text{-H}^{\text{proR}}} = 11.3$ Hz, $^3J_{2\text{-H}^{\text{proS}}, 3\text{-H}} = 1.7$ Hz, 1 H, 2^B-H^{proS}), 3.12 ppm (dd, $^2J_{2\text{-H}^{\text{proR}}, 2\text{-H}^{\text{proS}}} = 11.4$ Hz, $^3J_{2\text{-H}^{\text{proR}}, 3\text{-H}} = 6.0$ Hz, 1 H, 2^B-H^{proR}), 2.96 ppm (dd, $^2J_{2\text{-H}^{\text{proS}}, 2\text{-H}^{\text{proR}}} = 11.4$ Hz, $^3J_{2\text{-H}^{\text{proS}}, 3\text{-H}} = 1.8$ Hz, 1 H, 2^A-H^{proS}), 1.29 ppm (s, 6 H, Isopr.-CH₃), 1.28 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃) 1.27 ppm (s, 3 H, Isopr.-CH₃).

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO-d₆); δ = 169.6 ppm (CO₂CH₃), 168.4 ppm (3^A-CO), 164.5 ppm (5^A-CO), 163.7 ppm (5^B-CO), 108.9 ppm (Isopr.-quart.), 108.7 ppm (Isopr.-quart.), 75.5 ppm (8²-C), 75.2 ppm (7^B-C), 75.1 ppm (8^A-C), 74.3 ppm (7^A-C), 61.9 ppm (3^A-C), 61.3 ppm (3^B-C), 61.1 ppm (6^A-C), 60.6 ppm (8a^B-C), 59.4 ppm (8a^A-C), 53.0 ppm (6^B-C), 52.6 ppm (CO₂CH₃), 32.4 ppm (2^A-C), 31.1 ppm (2^B-C), 26.1 ppm (2x Isopr.-CH₃), 24.0 ppm (Isopr.-CH₃), 23.9 ppm (Isopr.-CH₃).

HRMS (ESI): für C₂₃H₃₄N₇O₉S₂⁺ (M+H⁺), ber.: 616.1854, gef.: 616.1858.

CHN-Analyse: ber.: C: 46.14% H: 5.05% N: 14.04%

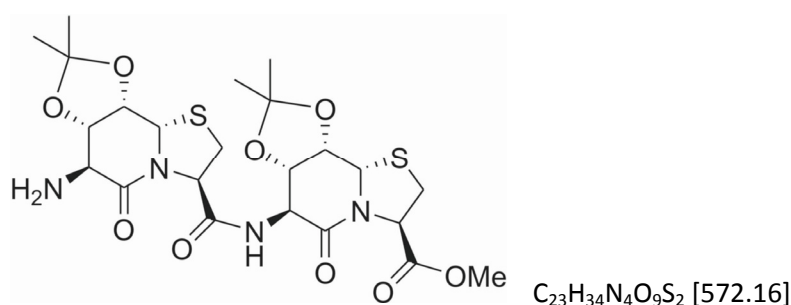
gef.: C: 45.81% H: 5.09% N: 13.50%.

IR (KBr): $\hat{\nu}$ = 2978 w, 2951 w, 2931 w, 2113 s, 1752 s, 1676 s, 1528 m, 1421 m, 1376 m, 1338 m, 1215 s, 1064 s, 889 m.

Drehwert: $[\alpha]_{\text{D}}^{15.0} = -195.2$, $[\alpha]_{578}^{15.0} = -205.2$, $[\alpha]_{546}^{15.0} = -237.0$, $[\alpha]_{436}^{15.0} = -445.3$, $[\alpha]_{365}^{15.0} = -779.3$,

(c = 0.94 g/100 mL, CHCl₃).

(6S)-amino-Pli^P=Cat-Pli^P=Cat-OMe (55)



550 mg (0.92 mmol) der Verbindung (**54**) wurden in 10.0 mL MeOH/DCM (1:1) gelöst und mit 60 mg Palladium auf Aktivkohle (10%ig) versetzt. Der Ansatz wurde für zwei Stunden unter einer Wasserstoffatmosphäre von 10 bar im Autoklaven gerührt. Zum Abtrennen des Katalysators wurde über Kieselgur filtriert, das Filtrat eingengt und am Hochvakuum getrocknet. Es wurden 525 mg (0.92 mmol, 99%) der Verbindung (**55**) als farblores Pulvers erhalten.

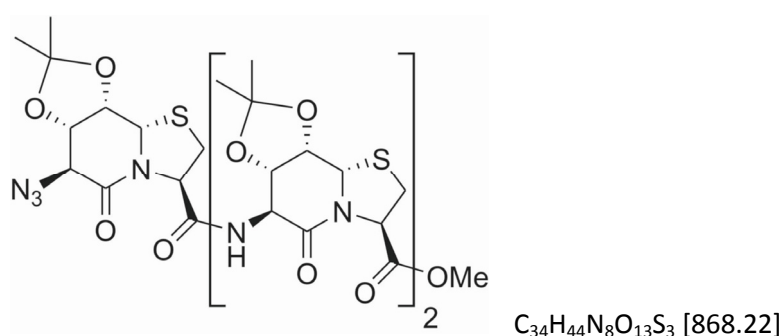
¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆); δ = 8.20 ppm (d, $^3J_{6\text{-NH}, 6\text{-H}} = 8.0$ Hz, 1 H, 6^B-NH), 5.50 ppm (d, $^3J_{8a\text{-H}, 8\text{-H}} = 2.1$ Hz, 1 H, 8a^A-H), 5.29 ppm (dd, $^3J_{3\text{-H}, 2\text{-H}^{\text{proR}}} = 6.0$ Hz, $^3J_{3\text{-H}, 2\text{-H}^{\text{proS}}} = 1.8$ Hz, 1 H, 3^B-H), 5.25 ppm (d, $^3J_{8a\text{-H}, 8\text{-H}} = 2.0$ Hz, 1 H, 8a^B-H), 5.09 ppm (dd, $^3J_{3\text{-H}, 2\text{-H}^{\text{proR}}} = 6.8$ Hz, $^3J_{3\text{-H}, 2\text{-H}^{\text{proS}}} = 1.7$ Hz, 1 H, 3^A-H), 4.57 ppm (dd, $^3J_{8\text{-H}, 7\text{-H}} = 7.1$ Hz, $^3J_{8\text{-H}, 8a\text{-H}} = 2.0$ Hz, 1 H, 8^B-H), 4.49 ppm (dd,

$^3J_{8^A-H,7^A-H} = 7.2$ Hz, $^3J_{8^A-H,8a^A-H} = 2.1$ Hz, 1 H, 8^A-H), 4.40 ppm (dd, $^3J_{7^B-H,8^B-H} = 7.1$ Hz, $^3J_{7^B-H,6^B-H} = 2.0$ Hz, 1 H, 7^B-H), 4.36 ppm (dd, $^3J_{7^A-H,8^A-H} = 7.5$ Hz, $^3J_{7^A-H,6^A-H} = 2.0$ Hz, 1 H, 7^A-H), 4.35 ppm (dd, $^3J_{6^B-N,6^B-NH} = 7.8$ Hz, $^3J_{6^B-H,7^B-H} = 2.1$ Hz, 1 H, 6^B-H), 3.68 ppm (s, 3 H, CO_2CH_3), 3.48 ppm (d, $^3J_{6^A-H,7^A-H} = 2.2$ Hz, 1 H, 6^A-H), 3.16 ppm (dd, $^2J_{2^B-H^{proS},2^B-H^{proR}} = 11.5$ Hz, $^3J_{2^B-H^{proS},3^B-H} = 2.0$ Hz, 1 H, 2^B-H^{pro}), 3.14 ppm (dd, $^2J_{2^A-H^{proR},2^A-H^{proS}} = 11.3$ Hz, $^3J_{2^A-H^{proR},3^A-H} = 7.0$ Hz, 1 H, 2^A-H^{proR}), 3.12 ppm (dd, $^2J_{2^B-H^{proR},2^B-H^{proS}} = 11.4$ Hz, $^3J_{2^B-H^{proR},3^B-H} = 6.0$ Hz, 1 H, 2^B-H^{proR}), 2.94 ppm (dd, $^2J_{2^A-H^{proS},2^A-H^{proR}} = 11.3$ Hz, $^3J_{2^A-H^{proS},3^A-H} = 1.9$ Hz, 1 H, 2^A-H^{proS}), 2.05 ppm (bs, 2H, NH_2) 1.28 ppm (s, 3 H, Isopr.- CH_3), 1.27 ppm (s, 3 H, Isopr.- CH_3) 1.26 ppm (s, 3 H, Isopr.- CH_3), 1.24 ppm (s, 3 H, Isopr.- CH_3).

^{13}C -NMR: (125 MHz, $DMSO-d_6$); $\delta = 170.2$ ppm (CO_2CH_3), 169.8 ppm (5^A-CO), 169.6 ppm (3^A-CO), 165.0 ppm (5^B-CO), 109.2 ppm (Isopr.- $quart.$), 108.5 ppm (Isopr.- $quart.$), 77.6 ppm (7^A-C), 76.3 ppm (8^A-C), 76.0 ppm (8^B-C), 75.8 ppm (7^B-C), 62.5 ppm (3^A-C), 61.8 ppm (3^B-C), 60.7 ppm ($8a^A-C$), 60.0 ppm ($8a^B-C$), 56.6 ppm (6^A-C), 53.5 ppm (6^B-C), 53.1 ppm (CO_2CH_3), 32.4 ppm (2^A-C), 31.6 ppm (2^B-C), 26.8 ppm (Isopr.- CH_3), 26.6 ppm (Isopr.- CH_3), 24.5 ppm (Isopr.- CH_3), 24.4 ppm (Isopr.- CH_3).

HRMS (ESI): für $C_{23}H_{32}N_4O_9S_2 Na^+$ ($M+Na^+$), ber.: 595.1503, gef.: 595.1505.

(6S)-azido- $Pli^P=Cat-[Pli^P=Cat]_2-OMe$ (56)



820 mg (2.5 mmol, 1.0 eq) der Verbindung **(5)** wurden in 10.0 mL Methanol gelöst, es erfolgte die Zugabe von 5 mL (5.0 mmol, 2.0 eq) 1N LiOH. Durch DC-Kontrolle (DCM/EE 2:1) wurde der Reaktionsfortschritt verfolgt. Nach vollständiger Hydrolyse des Esters wurde mit 1N HCl neutralisiert, das Lösungsmittel entfernt, zwei Mal mit Toluol/Ethanol koevaporiert und der Ansatz am Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde in 20.0 mL DMF aufgenommen, es wurden 1.06 g (2.8 mmol, 1.1 eq) HBTU, 430 mg (2.8 mmol, 1.1 eq) HOBt und 1.41 g (2.5 mmol, 1.0 eq) **(55)** zugegeben. Der pH-Wert wurde durch DIPEA-Zugabe auf pH = 8 eingestellt und der Ansatz für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand in 100 mL Essigsäureethylester aufgenommen und gegen jeweils 50.0 mL Salzsäure ($c = 0.5$ mol/L), gesättigte $NaHCO_3$ -Lösung sowie gesättigte NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wurden über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand

saurem Ionenaustauscher neutralisiert und anschließend das Harz abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, es wurde zwei Mal mit Toluol/Ethanol koevaporiert und der Ansatz am Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde in 20.0 mL DMF aufgenommen, es wurden 300 mg (0.79 mmol, 1.0 eq) HBTU, 125 mg (0.79 mmol, 1.0 eq) HOBt und 450 mg (0.79 mmol, 1.0 eq) (**55**) zugegeben. Der pH-Wert wurde durch DIPEA-Zugabe auf pH = 8 eingestellt und der Ansatz für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand in 100 mL Essigsäureethylester aufgenommen und gegen jeweils 50.0 mL Salzsäure ($c = 0.5 \text{ mol/L}$), gesättigte NaHCO_3 -Lösung sowie gesättigte NaCl -Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde abschließend säulenchromatographisch aufgereinigt ($\text{DCM/MeOH } 20:1$; $R_f = 0.37$). Es wurden 500 g (0.44 mmol, 56%) der Verbindung (**57**) in Form eines farblosen Pulvers erhalten.

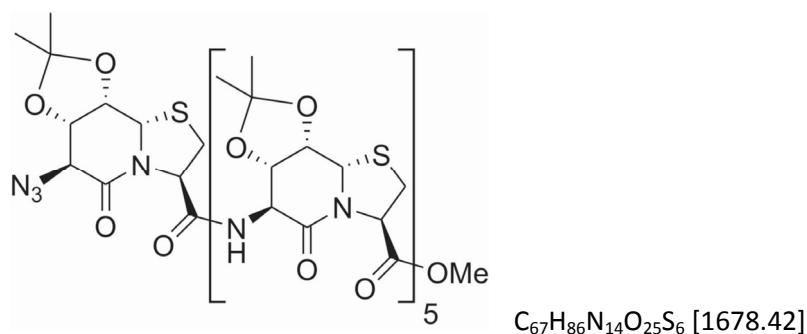
$^1\text{H-NMR}$: (600 MHz, DMSO-d_6); $\delta = 8.54 \text{ ppm}$ (d, $^3J_{6^{\text{B-NH}}, 6^{\text{B-H}}} = 4.3 \text{ Hz}$, 1 H, $6^{\text{B-NH}}$), 7.98 ppm (d, $^3J_{6^{\text{C-NH}}, 6^{\text{C-H}}} = 4.2 \text{ Hz}$, 1 H, $6^{\text{C-NH}}$), 7.96 ppm (d, $^3J_{6^{\text{D-NH}}, 6^{\text{D-H}}} = 7.2 \text{ Hz}$, 1 H, $6^{\text{D-NH}}$), 5.30 ppm (dd, $^3J_{3^{\text{D-H}}, 2^{\text{D-H}}\text{proR}} = 6.3 \text{ Hz}$, $^3J_{3^{\text{D-H}}, 2^{\text{D-H}}\text{proS}} = 1.4 \text{ Hz}$, 1 H, $3^{\text{D-H}}$), 5.24 ppm (d, $^3J_{8^{\text{A-D}}, 8^{\text{D-H}}} = 2.1 \text{ Hz}$, 1 H, $8^{\text{A-D}}$), 5.20 ppm (d, $^3J_{8^{\text{A-H}}, 8^{\text{A-H}}} = 1.9 \text{ Hz}$, 1 H, $8^{\text{A-H}}$), 5.19 ppm (dd, $^3J_{3^{\text{B-H}}, 2^{\text{B-H}}\text{proR}} = 6.5 \text{ Hz}$, $^3J_{3^{\text{B-H}}, 2^{\text{B-H}}\text{proS}} = 2.0 \text{ Hz}$, 1 H, $3^{\text{B-H}}$), 5.16 ppm (dd, $^3J_{3^{\text{C-H}}, 2^{\text{C-H}}\text{proR}} = 6.5 \text{ Hz}$, $^3J_{3^{\text{C-H}}, 2^{\text{C-H}}\text{proS}} = 1.2 \text{ Hz}$, 1 H, $3^{\text{C-H}}$), 5.15 ppm (d, $^3J_{8^{\text{A-C}}, 8^{\text{C-H}}} = 2.0 \text{ Hz}$, 1 H, $8^{\text{A-C}}$), 5.13 ppm (d, $^3J_{8^{\text{B-H}}, 8^{\text{B-H}}} = 1.9 \text{ Hz}$, 1 H, $8^{\text{B-H}}$), 5.07 ppm (dd, $^3J_{3^{\text{A-H}}, 2^{\text{A-H}}\text{proR}} = 6.6 \text{ Hz}$, $^3J_{3^{\text{A-H}}, 2^{\text{A-H}}\text{proS}} = 2.2 \text{ Hz}$, 1 H, $3^{\text{A-H}}$), 4.62 ppm (dd, $^3J_{7^{\text{C-H}}, 8^{\text{C-H}}} = 7.1 \text{ Hz}$, $^3J_{7^{\text{C-H}}, 6^{\text{C-H}}} = 2.2 \text{ Hz}$, 1 H, $7^{\text{C-H}}$), $4.60\text{--}4.58 \text{ ppm}$ (m, 2 H, $8^{\text{A-H}}/8^{\text{D-H}}$), 4.57 ppm (dd, $^3J_{7^{\text{B-H}}, 8^{\text{B-H}}} = 7.1 \text{ Hz}$, $^3J_{7^{\text{B-H}}, 6^{\text{B-H}}} = 2.2 \text{ Hz}$, 1 H, $7^{\text{B-H}}$), 4.53 ppm (dd, $^3J_{7^{\text{A-H}}, 8^{\text{A-H}}} = 7.1 \text{ Hz}$, $^3J_{7^{\text{A-H}}, 6^{\text{A-H}}} = 2.3 \text{ Hz}$, 1 H, $7^{\text{A-H}}$), 4.50 ppm (dd, $^3J_{7^{\text{D-H}}, 8^{\text{D-H}}} = 7.2 \text{ Hz}$, $^3J_{7^{\text{D-H}}, 6^{\text{D-H}}} = 2.1 \text{ Hz}$, 1 H, $7^{\text{D-H}}$), $4.51\text{--}4.48 \text{ ppm}$ (m, 2 H, $8^{\text{B-H}}/8^{\text{C-H}}$), 4.48 ppm (d, $^3J_{6^{\text{A-H}}, 7^{\text{A-H}}} = 1.9 \text{ Hz}$, 1 H, $6^{\text{A-H}}$), 4.33 ppm (dd, $^3J_{6^{\text{D-NH}}, 6^{\text{D-NH}}} = 7.1 \text{ Hz}$, $^3J_{6^{\text{D-H}}, 7^{\text{D-H}}} = 2.0 \text{ Hz}$, 1 H, $6^{\text{D-H}}$), 4.20 ppm (dd, $^3J_{6^{\text{C-NH}}, 6^{\text{C-NH}}} = 4.3 \text{ Hz}$, $^3J_{6^{\text{C-H}}, 7^{\text{C-H}}} = 2.2 \text{ Hz}$, 1 H, $6^{\text{C-H}}$), 4.15 ppm (dd, $^3J_{6^{\text{B-NH}}, 6^{\text{B-NH}}} = 4.2 \text{ Hz}$, $^3J_{6^{\text{B-H}}, 7^{\text{B-H}}} = 2.2 \text{ Hz}$, 1 H, $6^{\text{B-H}}$), 3.67 ppm (s, 3 H, CO_2CH_3), $3.23\text{--}3.08 \text{ ppm}$ (m, 8 H, $2^{\text{A-H}}/2^{\text{B-H}}/2^{\text{C-H}}/2^{\text{D-H}}$), $1.30\text{--}1.26 \text{ ppm}$ (m, 24 H, Isopr.- CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$: (150 MHz, DMSO-d_6); $\delta = 169.6 \text{ ppm}$ (CO_2CH_3), 169.5 ppm ($3^{\text{B-CO}}$), 169.3 ppm ($3^{\text{A-CO}}$), 168.7 ppm ($3^{\text{C-CO}}$), 165.7 ppm ($5^{\text{C-CO}}$), 165.6 ppm ($5^{\text{B-CO}}$), 164.3 ppm ($5^{\text{A-CO}}$), 164.2 ppm ($5^{\text{D-CO}}$), 108.9 ppm (Isopr.-quart.), 108.8 ppm (Isopr.-quart.), 108.7 ppm (Isopr.-quart.), 108.6 ppm (Isopr.-quart.), 76.5 ppm ($8^{\text{C-C}}$), 76.2 ppm ($8^{\text{B-C}}$), 75.8 ppm ($8^{\text{D-C}}$), 75.3 ppm ($8^{\text{A-C}}$), 75.1 ppm ($7^{\text{D-C}}$), 75.0 ppm ($7^{\text{B-C}}/7^{\text{C-C}}$), 74.4 ppm ($7^{\text{A-C}}$), 63.6 ppm ($8^{\text{A-D-C}}$), 63.1 ppm ($3^{\text{C-C}}$), 62.8 ppm ($8^{\text{A-C}}$), 61.3 ppm ($8^{\text{A-C}}$), 61.0 ppm ($6^{\text{A-C}}$), 60.8 ppm ($3^{\text{D-C}}$), 60.5 ppm ($3^{\text{A-C}}$), 60.3 ppm ($3^{\text{C-C}}$), 59.3 ppm ($3^{\text{B-C}}$), 54.5 ppm ($6^{\text{C-C}}$), 54.4 ppm ($6^{\text{B-C}}$), 53.5 ppm ($6^{\text{D-C}}$), 52.5 ppm (CO_2CH_3), 32.2 ppm (2-C), 31.1 ppm (2x 2-C), 30.7 ppm

(2-C), 26.1 ppm (3x Isopr.-CH₃), 26.0 ppm (Isopr.-CH₃), 24.0 ppm (Isopr.-CH₃), 23.9 ppm (Isopr.-CH₃), 23.8 ppm (Isopr.-CH₃), 23.7 ppm (Isopr.-CH₃).

HRMS (ESI): für C₄₅H₅₈N₁₀O₁₇S₄ Na⁺ (M+Na⁺), ber.: 1161.2756, gef.: 1161.2756.

(6S)-azido-Pli^P=Cat-[Pli^P=Cat]₅-OMe (58)



100 mg (0.12 mmol) der Verbindung **(56)** wurden in 5.00 mL MeOH/DCM gelöst und mit 20.0 mg Palladium auf Aktivkohle (10%ig) versetzt. Der Ansatz wurde für vier Tage unter einer Wasserstoffatmosphäre von 10 bar im Autoklaven gerührt. Zum Abtrennen des Katalysators wurde über Kieselgur filtriert, das Filtrat eingeeengt und am Hochvakuum getrocknet. Ebenfalls 100 mg (0.12 mmol, 1.0 eq) der Verbindung **(56)** wurden in 2 mL 1,4-Dioxan/Wasser gelöst, es erfolgte die Zugabe von 210 µL (0.21 mmol, 1.8 eq) 1N LiOH. Durch DC-Kontrolle (DCM/MeOH 10:1) wurde der Reaktionsfortschritt verfolgt. Nach vollständiger Hydrolyse des Esters wurde mit stark saurem Ionenaustauscher neutralisiert und anschließend das Harz abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, es wurde zwei Mal mit Toluol/Ethanol ko-evaporiert und der Ansatz am Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde in 10.0 mL DMF aufgenommen, es wurden 60 mg (0.16 mmol, 1.3 eq) HBTU, 25 mg (0.16 mmol, 1.3 eq) HOBt und die zuvor reduzierte Verbindung **(56)** zugegeben. Der pH-Wert wurde durch DIPEA-Zugabe auf pH = 8 eingestellt und der Ansatz für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand in 100 mL Essigsäureethylester aufgenommen und gegen jeweils 50.0 mL Salzsäure (c = 0.5 mol/L), gesättigte NaHCO₃-Lösung sowie gesättigte NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde abschließend säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 30:1; R_f = 0.34 in DCM/MeOH 10:1). Es wurden 45 mg (0.027 mmol, 23%) der Verbindung **(58)** in Form eines farblosen Pulvers erhalten.

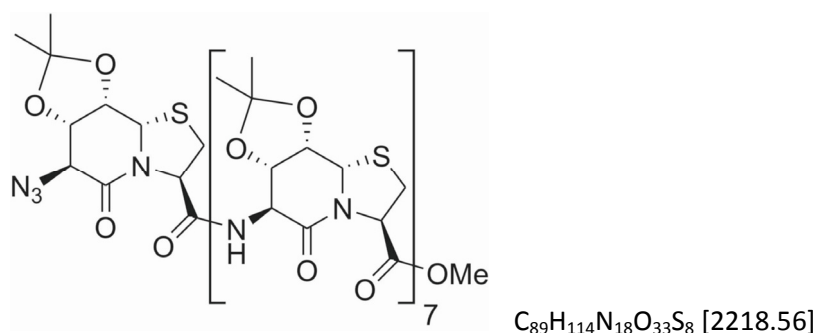
¹H-NMR: (600 MHz, DMSO-d₆); δ = 8.60 ppm (d, ³J_{6-NH,6-H} = 3.9 Hz, 1 H, 6-NH), 7.95 ppm (d, ³J_{6-NH,6-H} = 2.8 Hz, 1 H, 6-NH), 7.88 ppm (d, ³J_{6-NH,6-H} = 7.2 Hz, 1 H, 6-NH), 7.76 ppm (d, ³J_{6-NH,6-H} = 3.3 Hz, 1 H, 6-NH), 7.73 ppm (d, ³J_{6-NH,6-H} = 3.9 Hz, 1 H, 6-NH), 5.31-5.28 ppm (m, 2 H, 3-H), 5.24 ppm (d, ³J_{8a-H,8-H} = 1.8 Hz, 1 H, 8a-H), 5.23-5.15 ppm (m, 6 H, 3-H/8a-H), 5.15-5.11 ppm (m, 2 H, 3-H/8a-H), 5.08 ppm (dd, ³J_{3-H,2-H}^{proR} = 6.1 Hz, ³J_{3-H,2-H}^{proS} = 2.5 Hz, 1 H, 3-H), 4.69 ppm (dd, ³J_{7-H,8-H} = 7.1 Hz,

$^3J_{7-H,6-H} = 2.3$ Hz, 1 H, 7-H), 4.67-4.64 ppm (m, 2 H, 7-H/8-H), 4.62-4.57 ppm (m, 3 H, 7-H/8-H), 4.55-4.50 ppm (m, 4 H, 7-H/8-H), 4.50-4.47 ppm (m, 3 H, 6-H/7-H/8-H), 4.32 ppm (dd, $^3J_{6-N,6-NH} = 7.1$ Hz, $^3J_{6-H,7-H} = 1.9$ Hz, 1 H, 6-H), 4.15 ppm (dd, $^3J_{6-N,6-NH} = 3.9$ Hz, $^3J_{6-H,7-H} = 1.9$ Hz, 1 H, 6-H), 4.14 ppm (dd, $^3J_{6-N,6-NH} = 3.9$ Hz, $^3J_{6-H,7-H} = 2.0$ Hz, 1 H, 6-H), 4.12 ppm (dd, $^3J_{6-N,6-NH} = 3.4$ Hz, $^3J_{6-H,7-H} = 2.1$ Hz, 1 H, 6-H), 4.10 ppm (dd, $^3J_{6-N,6-NH} = 2.8$ Hz, $^3J_{6-H,7-H} = 2.2$ Hz, 1 H, 6-H), 3.67 ppm (s, 3 H, CO_2CH_3), 3.23-3.07 ppm (m, 12 H, 2-H), 1.32-1.23 ppm (m, 36 H, Isopr.- CH_3).

^{13}C -NMR: (150 MHz, DMSO-d_6); $\delta = 169.9$ ppm (CO_2CH_3), 169.9 ppm (3-CO), 169.6 ppm (3-CO), 169.5 ppm (3-CO), 169.4 ppm (3-CO), 168.6 ppm (3-CO), 166.1 ppm (5-CO), 166.1 ppm (5-CO), 165.9 ppm (5-CO), 165.8 ppm (5-CO), 164.3 ppm (5-CO), 164.1 ppm (5-CO), 108.9 ppm (Isopr.-quart.), 108.9 ppm (Isopr.-quart.), 108.8 ppm (Isopr.-quart.), 108.7 ppm (Isopr.-quart.), 108.7 ppm (Isopr.-quart.), 108.5 ppm (Isopr.-quart.), 76.6 ppm (7-C/8-C), 76.6 ppm (7-C/8-C), 76.2 ppm (7-C/8-C), 75.7 ppm (7-C/8-C), 75.3 ppm (7-C/8-C), 75.3 ppm (7-C/8-C), 75.1 ppm (7-C/8-C), 75.0 ppm (7-C/8-C), 75.0 ppm (7-C/8-C), 74.9 ppm (7-C/8-C), 74.8 ppm (7-C/8-C), 74.4 ppm (7-C/8-C), 64.1 ppm (3-C/8a-C), 64.0 ppm (3-C/8a-C), 63.8 ppm (3-C/8a-C), 63.1 ppm (3-C/8a-C), 62.8 ppm (3-C/8a-C), 61.3 ppm (6-C), 61.3 ppm (3-C/8a-C), 61.0 ppm (3-C/8a-C), 60.7 ppm (3-C/8a-C), 60.7 ppm (3-C/8a-C), 60.6 ppm (3-C/8a-C), 60.5 ppm (3-C/8a-C), 59.3 ppm (3-C/8a-C), 55.0 ppm (6-C), 54.9 ppm (6-C), 54.6 ppm (6-C), 54.5 ppm (6-C), 53.5 ppm (6-C), 52.5 ppm (CO_2CH_3), 32.2 ppm (2-C), 31.1 ppm (2-C), 31.0 ppm (2-C), 31.0 ppm (2-C), 30.8 ppm (2-C), 30.4 ppm (2-C), 26.1 ppm (2x Isopr.- CH_3), 26.0 ppm (2x Isopr.- CH_3), 26.0 ppm (2x Isopr.- CH_3), 24.0 ppm (Isopr.- CH_3), 23.9 ppm (Isopr.- CH_3), 23.8 ppm (Isopr.- CH_3), 23.8 ppm (Isopr.- CH_3), 23.7 ppm (Isopr.- CH_3), 23.7 ppm (Isopr.- CH_3).

HRMS (ESI): für $\text{C}_{67}\text{H}_{86}\text{N}_{14}\text{O}_{25}\text{S}_6 \text{ Na}^+$ ($\text{M}+\text{Na}^+$), ber.: 1701.4105, gef.: 1701.4096.

(6S)-azido- $\text{Pli}^{\text{P}}=\text{Cat}$ - $[\text{Pli}^{\text{P}}=\text{Cat}]_7$ -OMe (59)



120 mg (0.11 mmol) der Verbindung **(57)** wurden in 2.00 mL MeOH/DCM gelöst und mit 20.0 mg Palladium auf Aktivkohle (10%ig) versetzt. Der Ansatz wurde für zwei Tage unter einer Wasserstoffatmosphäre von 10 bar im Autoklaven gerührt. Zum Abtrennen des Katalysators wurde über Kieselgur filtriert, das Filtrat eingeeengt und am Hochvakuum getrocknet. Weitere 140 mg (0.12 mmol, 1.0 eq) der Verbindung **(57)** wurden in 2 mL 1,4-Dioxan/Wasser gelöst, es erfolgte die Zugabe von 375 μL (0.38 mmol, 3.0 eq) 1N LiOH. Durch DC-Kontrolle (DCM/MeOH 10:1) wurde der

Reaktionsfortschritt verfolgt. Nach vollständiger Hydrolyse des Esters wurde mit stark saurem Ionenaustauscher neutralisiert und anschließend das Harz abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, es wurde zwei Mal mit Toluol/Ethanol koevaporiert und der Ansatz am Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde in 10.0 mL DMF aufgenommen, es wurden 56.0 mg (0.15 mmol, 1.2 eq) HBTU, 23.0 mg (0.15 mmol, 1.2 eq) HOBt und die zuvor reduzierte Verbindung (**57**) zugegeben. Der pH-Wert wurde durch DIPEA-Zugabe auf pH = 8 eingestellt und der Ansatz für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand in 50.0 mL EE/DCM aufgenommen und gegen jeweils 50.0 mL Salzsäure ($c = 1.0 \text{ mol/L}$), gesättigte NaHCO_3 -Lösung sowie gesättigte NaCl -Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde abschließend drei Mal säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 20:1, DCM/MeOH 30:1; DCM/MeOH 30:1 $R_f = 0.27$ in DCM/MeOH 20:1). Es wurden 28 mg (0.01 mmol, 8%) der Verbindung (**59**) in Form eines farblosen Pulvers erhalten.

$^1\text{H-NMR}$: (600 MHz, DMSO-d_6); $\delta = 8.60 \text{ ppm}$ (d, $^3J_{6\text{-NH},6\text{-H}} = 3.9 \text{ Hz}$, 1 H, 6-NH), 7.95 ppm (d, $^3J_{6\text{-NH},6\text{-H}} = 3.1 \text{ Hz}$, 1 H, 6-NH), 7.87 ppm (d, $^3J_{6\text{-NH},6\text{-H}} = 7.1 \text{ Hz}$, 1 H, 6-NH), 7.81 ppm (d, $^3J_{6\text{-NH},6\text{-H}} = 3.3 \text{ Hz}$, 1 H, 6-NH), 7.74 ppm (d, $^3J_{6\text{-NH},6\text{-H}} = 3.9 \text{ Hz}$, 1 H, 6-NH), 7.71 ppm (d, $^3J_{6\text{-NH},6\text{-H}} = 3.3 \text{ Hz}$, 1 H, 6-NH), 7.70 ppm (d, $^3J_{6\text{-NH},6\text{-H}} = 3.3 \text{ Hz}$, 1 H, 6-NH), 5.33-5.11 ppm (m, 15 H, 3-H/8a-H), 5.08 ppm (dd, $^3J_{3\text{-H},2\text{-H}} = 6.1 \text{ Hz}$, $^3J_{3\text{-H},2\text{-H}} = 2.5 \text{ Hz}$, 1 H, 3-H), 4.72-4.68 ppm (m, 3 H, 7-H/8-H), 4.67 ppm (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H,H}} = 2.2 \text{ Hz}$, 1 H, 7-H/8-H), 4.63-4.48 ppm (m, 13 H, 6-H/7-H/8-H), 4.32 ppm (dd, $^3J_{6\text{-N},6\text{-NH}} = 7.3 \text{ Hz}$, $^3J_{6\text{-H},7\text{-H}} = 2.0 \text{ Hz}$, 1 H, 6-H), 4.16-4.13 ppm (m, 2 H, 6-H), 4.13-4.10 ppm (m, 2 H, 6-H), 4.10-4.08 ppm (m, 1 H, 6-H), 4.08-4.07 ppm (m, 1 H, 6-H), 3.67 ppm (s, 3 H, CO_2CH_3), 3.25-3.07 ppm (m, 16 H, 2-H), 1.34-1.21 ppm (m, 48 H, Isopr.- CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$: (150 MHz, DMSO-d_6); $\delta = 170.2 \text{ ppm}$ (3-CO), 170.1 ppm (3-CO), 170.0 ppm (3-CO), 169.9 ppm (3-CO), 169.6 ppm (3-CO/ CO_2CH_3), 169.5 ppm (3-CO), 168.6 ppm (3-CO), 166.3 ppm (5-CO), 166.1 ppm (5-CO), 166.0 ppm (5-CO), 165.9 ppm, 165.8 ppm (5-CO), 164.3 ppm (5-CO), 164.2 ppm (5-CO), 108.9 ppm (Isopr.-quart.), 108.9 ppm (Isopr.-quart.), 108.8 ppm (Isopr.-quart.), 108.8 ppm (Isopr.-quart.), 108.8 ppm (Isopr.-quart.), 108.8 ppm (Isopr.-quart.), 108.7 ppm (Isopr.-quart.), 108.5 ppm (Isopr.-quart.), 76.7 ppm (7-C/8-C), 76.6 ppm (7-C/8-C), 76.3 ppm (7-C/8-C), 75.8 ppm (7-C/8-C), 75.3 ppm (7-C/8-C), 75.1 ppm (7-C/8-C), 75.0 ppm (7-C/8-C), 75.0 ppm (7-C/8-C), 74.9 ppm (7-C/8-C), 74.8 ppm (7-C/8-C), 74.4 ppm (7-C/8-C), 64.2 ppm (3-C/8a-C), 64.2 ppm (3-C/8a-C), 64.1 ppm (3-C/8a-C), 64.0 ppm (3-C/8a-C), 63.8 ppm (3-C/8a-C), 63.2 ppm (3-C/8a-C), 62.8 ppm (3-C/8a-C), 61.3 ppm (3-C/8a-C), 61.0 ppm (3-C/8a-C), 60.7 ppm (3-C/8a-C), 60.6 ppm (3-C/8a-C), 60.6 ppm (3-C/8a-C), 60.5 ppm (3-C/8a-C), 60.3 ppm (3-C/8a-C), 59.3 ppm (3-C/8a-C), 55.0 ppm (6-C), 54.9 ppm (6-C), 54.9 ppm (6-C), 54.9 ppm (6-C), 54.6 ppm (6-C), 54.6 ppm (6-C), 53.5 ppm (6-C), 52.5 ppm

(CO₂CH₃), 32.2 ppm (2-C), 31.1 ppm (2-C), 31.0 ppm (2-C), 30.9 ppm (2-C), 30.9 ppm (2-C), 30.8 ppm (2-C), 30.8 ppm (2-C), 30.4 ppm (2-C), 26.1-25.9 ppm (8x Isopr.-CH₃), 24.0-23.6 ppm (8x Isopr.-CH₃).

HRMS (ESI): für C₈₉H₁₁₄N₁₈O₃₃S₈Na₂²⁺ (M+Na₂²⁺), ber.: 1132.2673, gef.: 1132.2693.

[Glu⁹, Pli¹⁷=Cat¹⁸]-Foldon (60)

C₁₄₅H₂₁₈N₃₆O₄₁S [3151.58]

Die Verbindung **(60)** wurde mittels Festphasensynthese in 0.2 millimolarem Maßstab entsprechend dem **Festphasenprotokoll I** dargestellt. Die Abspaltung vom Harz sowie die Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen erfolgte mit TFA/H₂O/TIPS/Phenol 95:2:2:1 über einen Zeitraum von 90 Minuten. Das Peptid wurde in Diethylether gefällt, abzentrifugiert und anschließend vier Mal mit Ether gewaschen. Der Rückstand wurde mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt, die Produktfraktionen konnten durch das Indol-Signal bei λ = 278 nm identifiziert werden. Nach anschließender Lyophilisierung konnten 63 mg (0.02 mmol, 20%) als farbloser Rückstand erhalten werden.

HRMS (ESI): für C₁₄₅H₂₂₁N₃₆O₄₁S³⁺ (M+3 H⁺), ber.: 1051.5340, gef.: 1051.5377.

RT (HPLC): 10%-99% MeCN (30 min): 11.91 min.

[D-Ala¹⁰, Pli¹⁷=Cat¹⁸]-Foldon (61)

C₁₄₅H₂₁₈N₃₆O₄₁S [3151.58]

Die Verbindung **(61)** wurde mittels Festphasensynthese in 0.2 millimolarem Maßstab entsprechend dem **Festphasenprotokoll I** dargestellt. Die Abspaltung vom Harz sowie die Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen erfolgte mit TFA/H₂O/TIPS/Phenol 95:2:2:1 über einen Zeitraum von 90 Minuten. Das Peptid wurde in Diethylether gefällt, abzentrifugiert und anschließend vier Mal mit Ether gewaschen. Der Rückstand wurde mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt, die Produktfraktionen konnten durch das Indol-Signal bei λ = 278 nm identifiziert werden. Nach anschließender Lyophilisierung konnten 68 mg (0.02 mmol, 22%) als farbloser Rückstand erhalten werden.

HRMS (ESI): für C₁₄₅H₂₂₁N₃₆O₄₁S³⁺ (M+3 H⁺), ber.: 1051.5340, gef.: 1051.5370.

RT (HPLC): 10%-99% MeCN (30 min): 12.14 min.

[Pro⁻², Hyp⁻¹, Glu⁹, Pli¹⁷=Cat¹⁸]-Foldon (62)

C₁₅₅H₂₃₂N₃₈O₄₄S [3361.68]

Die Verbindung **(62)** wurde mittels Festphasensynthese in 0.1 millimolarem Maßstab entsprechend dem **Festphasenprotokoll I** dargestellt. Die Abspaltung vom Harz sowie die Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen erfolgte mit TFA/H₂O/TIPS/Phenol 95:2:2:1 über einen Zeitraum von

90 Minuten. Das Peptid wurde in Diethylether gefällt, abzentrifugiert und anschließend vier Mal mit Ether gewaschen. Der Rückstand wurde mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt, die Produktfraktionen konnten durch das Indol-Signal bei $\lambda = 278$ nm identifiziert werden. Nach anschließender Lyophilisierung konnten 37 mg (0.01 mmol, 11%) als farbloser Rückstand erhalten werden.

HRMS (ESI): für $C_{155}H_{235}N_{38}O_{44}S^{3+}$ ($M+3 H^+$), ber.: 1121.5675, gef.: 1121.5701.

RT (HPLC): 10%-99% MeCN (30 min): 12.35 min.

[Pro^{-2,-5}, Hyp^{-1,-4}, Gly⁻³, Glu⁹, Pli¹⁷=Cat¹⁸]-Foldon (63)

$C_{167}H_{249}N_{41}O_{48}S$ [3628.80]

Die Verbindung **(63)** wurde mittels Festphasensynthese in 0.1 millimolarem Maßstab entsprechend dem **Festphasenprotokoll I** dargestellt. Die Abspaltung vom Harz sowie die Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen erfolgte mit TFA/H₂O/TIPS/Phenol 95:2:2:1 über einen Zeitraum von 90 Minuten. Das Peptid wurde in Diethylether gefällt, abzentrifugiert und anschließend vier Mal mit Ether gewaschen. Der Rückstand wurde mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt, die Produktfraktionen konnten durch das Indol-Signal bei $\lambda = 278$ nm identifiziert werden. Nach anschließender Lyophilisierung konnten 40 mg (0.01 mmol, 11%) als farbloser Rückstand erhalten werden.

HRMS (ESI): für $C_{167}H_{252}N_{41}O_{48}S^{3+}$ ($M+3 H^+$), ber.: 1210.6081, gef.: 1210.6103.

RT (HPLC): 10%-99% MeCN (30 min): 12.08 min.

[Pro^{-2,-5,-8,-11,-14}, Hyp^{-1,-4,-7,-10,-13}, Gly^{-3,-6,-9,-12}, Glu⁹, Pli¹⁷=Cat¹⁸]-Foldon (64)

$C_{203}H_{300}N_{50}O_{60}S$ [4430.17]

Die Verbindung **(64)** wurde mittels Festphasensynthese in 0.1 millimolarem Maßstab entsprechend dem **Festphasenprotokoll I** dargestellt. Die Abspaltung vom Harz sowie die Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen erfolgte mit TFA/H₂O/TIPS/Phenol 95:2:2:1 über einen Zeitraum von 90 Minuten. Das Peptid wurde in Diethylether gefällt, abzentrifugiert und anschließend vier Mal mit Ether gewaschen. Der Rückstand wurde mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt, die Produktfraktionen konnten durch das Indol-Signal bei $\lambda = 278$ nm identifiziert werden. Nach anschließender Lyophilisierung konnten 28 mg (0.01 mmol, 6%) als farbloser Rückstand erhalten werden.

HRMS (ESI): für $C_{203}H_{304}N_{50}O_{60}S^{4+}$ ($M+4 H^+$), ber.: 1108.5493, gef.: 1108.5515.

RT (HPLC): 10%-99% MeCN (30 min): 11.89 min.

[Glu⁹, Pli^{17,23}=Cat^{18,24}]-Foldon (65) $C_{144}H_{212}N_{36}O_{42}S_2$ [3181.50]

Die Verbindung **(65)** wurde mittels Festphasensynthese in 0.1 millimolarem Maßstab entsprechend dem **Festphasenprotokoll I** dargestellt. Die Abspaltung vom Harz sowie die Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen erfolgte mit TFA/H₂O/TIPS/Phenol 95:2:2:1 über einen Zeitraum von 90 Minuten. Das Peptid wurde in Diethylether gefällt, abzentrifugiert und anschließend vier Mal mit Ether gewaschen. Der Rückstand wurde mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt, die Produktfraktionen konnten durch das Indol-Signal bei $\lambda = 278$ nm identifiziert werden. Nach anschließender Lyophilisierung konnten 57 mg (0.02 mmol, 17%) als farbloser Rückstand erhalten werden.

HRMS (ESI): für $C_{144}H_{215}N_{36}O_{42}S_2^{3+}$ (M+3 H⁺), ber.: 1061.8418, gef.: 1061.8438.

RT (HPLC): 10%-99% MeCN (30 min): 11.75 min.

[Glu⁹, Pli^{17,25}=Cat^{18,26}]-Foldon (66) $C_{140}H_{212}N_{36}O_{42}S_2$ [3133.50]

Die Verbindung **(66)** wurde mittels Festphasensynthese in 0.1 millimolarem Maßstab entsprechend dem **Festphasenprotokoll I** dargestellt. Die Abspaltung vom Harz sowie die Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen erfolgte mit TFA/H₂O/TIPS/Phenol 95:2:2:1 über einen Zeitraum von 90 Minuten. Das Peptid wurde in Diethylether gefällt, abzentrifugiert und anschließend vier Mal mit Ether gewaschen. Der Rückstand wurde mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt, die Produktfraktionen konnten durch das Indol-Signal bei $\lambda = 278$ nm identifiziert werden. Nach anschließender Lyophilisierung konnten 38 mg (0.01 mmol, 12%) als farbloser Rückstand erhalten werden.

HRMS (ESI): für $C_{140}H_{215}N_{36}O_{42}S_2^{3+}$ (M+3 H⁺), ber.: 1045.5073, gef.: 1045.5129.

RT (HPLC): 10%-99% MeCN (30 min): 10.61 min.

[Pro^{-2,-5,-8,-11,-14}, Hyp^{-1,-4,-7,-10,-13}, Gly^{-3,-6,-9,-12}, D-Ala¹⁰, Pli¹⁷=Cat¹⁸]-Foldon (67) $C_{203}H_{300}N_{50}O_{60}S$ [4430.17]

Die Verbindung **(67)** wurde mittels Festphasensynthese in 0.1 millimolarem Maßstab entsprechend dem **Festphasenprotokoll I** dargestellt. Die Abspaltung vom Harz sowie die Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen erfolgte mit TFA/H₂O/TIPS/Phenol 95:2:2:1 über einen Zeitraum von 90 Minuten. Das Peptid wurde in Diethylether gefällt, abzentrifugiert und anschließend vier Mal mit Ether gewaschen. Der Rückstand wurde mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt, die Produktfraktionen konnten durch das Indol-Signal bei $\lambda = 278$ nm identifiziert werden. Nach

anschließender Lyophilisierung konnten 26 mg (0.01 mmol, 6%) als farbloser Rückstand erhalten werden.

HRMS (ESI): für $C_{203}H_{304}N_{50}O_{60}S^{4+}$ ($M+4 H^+$), ber.: 1108.5493, gef.: 1108.5498.

RT (HPLC): 10%-99% MeCN (30 min): 11.29 min.

[D-Ala¹⁰, Pli^{17,23}=Cat^{18,24}]-Foldon (68)

$C_{144}H_{212}N_{36}O_{42}S_2$ [3183.50]

Die Verbindung **(68)** wurde mittels Festphasensynthese in 0.1 millimolarem Maßstab entsprechend dem **Festphasenprotokoll I** dargestellt. Die Abspaltung vom Harz sowie die Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen erfolgte mit TFA/H₂O/TIPS/Phenol 95:2:2:1 über einen Zeitraum von 90 Minuten. Das Peptid wurde in Diethylether gefällt, abzentrifugiert und anschließend vier Mal mit Ether gewaschen. Der Rückstand wurde mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt, die Produktfraktionen konnten durch das Indol-Signal bei $\lambda = 278$ nm identifiziert werden. Nach anschließender Lyophilisierung konnten 82 mg (0.03 mmol, 26%) als farbloser Rückstand erhalten werden.

HRMS (ESI): für $C_{144}H_{215}N_{36}O_{42}S_2^{3+}$ ($M+3 H^+$), ber.: 1061.5073, gef.: 1061.5095.

RT (HPLC): 10%-99% MeCN (30 min): 11.30 min.

[D-Ala¹⁰, Pli^{17,25}=Cat^{18,26}]-Foldon (69)

$C_{140}H_{212}N_{36}O_{42}S_2$ [3133.50]

Die Verbindung **(69)** wurde mittels Festphasensynthese in 0.1 millimolarem Maßstab entsprechend dem **Festphasenprotokoll I** dargestellt. Die Abspaltung vom Harz sowie die Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen erfolgte mit TFA/H₂O/TIPS/Phenol 95:2:2:1 über einen Zeitraum von 90 Minuten. Das Peptid wurde in Diethylether gefällt, abzentrifugiert und anschließend vier Mal mit Ether gewaschen. Der Rückstand wurde mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt, die Produktfraktionen konnten durch das Indol-Signal bei $\lambda = 278$ nm identifiziert werden. Nach anschließender Lyophilisierung konnten 55 mg (0.02 mmol, 18%) als farbloser Rückstand erhalten werden.

HRMS (ESI): für $C_{140}H_{215}N_{36}O_{42}S_2^{3+}$ ($M+3 H^+$), ber.: 1045.5073, gef.: 1045.5084.

RT (HPLC): 10%-99% MeCN (30 min): 10.33 min.

[D-Ala¹⁰, Pli^{3,17}=Cat^{4,18}]-Foldon (70)

$C_{142}H_{210}N_{36}O_{43}S_2$ [3173.53]

Die Verbindung **(70)** wurde mittels Festphasensynthese in 0.1 millimolarem Maßstab entsprechend dem **Festphasenprotokoll I** dargestellt. Die Abspaltung vom Harz sowie die Entfernung der

Seitenkettenschutzgruppen erfolgte mit TFA/H₂O/TIPS/Phenol 95:2:2:1 über einen Zeitraum von 90 Minuten. Das Peptid wurde in Diethylether gefällt, abzentrifugiert und anschließend vier Mal mit Ether gewaschen. Der Rückstand wurde mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt, die Produktfraktionen konnten durch das Indol-Signal bei $\lambda = 278$ nm identifiziert werden. Nach anschließender Lyophilisierung konnten 68 mg (0.02 mmol, 21%) als farbloser Rückstand erhalten werden.

HRMS (ESI): für C₁₄₂H₂₁₃N₃₆O₄₃S₂³⁺ (M+3 H⁺), ber.: 1058.1671, gef.: 1058.1697.

RT (HPLC): 10%-99% MeCN (30 min): 11.21 min.

[D-Ala¹⁰, Pli^{6,17}=Cat^{7,18}]-Foldon (71)

C₁₄₅H₂₁₆N₃₆O₄₃S₂ [3215.53]

Die Verbindung **(71)** wurde mittels Festphasensynthese in 0.1 millimolarem Maßstab entsprechend dem **Festphasenprotokoll I** dargestellt. Die Abspaltung vom Harz sowie die Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen erfolgte mit TFA/H₂O/TIPS/Phenol 95:2:2:1 über einen Zeitraum von 90 Minuten. Das Peptid wurde in Diethylether gefällt, abzentrifugiert und anschließend vier Mal mit Ether gewaschen. Der Rückstand wurde mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt, die Produktfraktionen konnten durch das Indol-Signal bei $\lambda = 278$ nm identifiziert werden. Nach anschließender Lyophilisierung konnten 64 mg (0.02 mmol, 20%) als farbloser Rückstand erhalten werden.

HRMS (ESI): für C₁₄₅H₂₁₉N₃₆O₄₃S₂³⁺ (M+3 H⁺), ber.: 1072.5172, gef.: 1072.5168.

RT (HPLC): 10%-99% MeCN (30 min): 11.50 min.

[ΔGly¹, Nal², D-Ala¹⁰, Pli¹⁷=Cat¹⁸]-Foldon (72)

C₁₄₇H₂₁₇N₃₅O₃₉S [3128.60]

Die Verbindung **(72)** wurde mittels Festphasensynthese in 0.1 millimolarem Maßstab entsprechend dem **Festphasenprotokoll I** dargestellt. Die Abspaltung vom Harz sowie die Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen erfolgte mit TFA/H₂O/TIPS/Phenol 95:2:2:1 über einen Zeitraum von 90 Minuten. Das Peptid wurde in Diethylether gefällt, abzentrifugiert und anschließend vier Mal mit Ether gewaschen. Der Rückstand wurde mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt, die Produktfraktionen konnten durch das Indol-Signal bei $\lambda = 278$ nm identifiziert werden. Nach anschließender Lyophilisierung konnten 42 mg (0.01 mmol, 13%) als farbloser Rückstand erhalten werden.

HRMS (ESI): für C₁₄₇H₂₂₀N₃₅O₃₉S³⁺ (M+3 H⁺), ber.: 1043.8671, gef.: 1043.8669.

RT (HPLC): 10%-99% MeCN (30 min): 11.99 min.

[ΔGly¹, Pyr², D-Ala¹⁰, Pli¹⁷=Cat¹⁸]-Foldon (73)

C₁₄₂H₂₁₄N₃₆O₃₉S [3081.50]

Die Verbindung **(73)** wurde mittels Festphasensynthese in 0.1 millimolarem Maßstab entsprechend dem **Festphasenprotokoll I** dargestellt. Die Abspaltung vom Harz sowie die Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen erfolgte mit TFA/H₂O/TIPS/Phenol 95:2:2:1 über einen Zeitraum von 90 Minuten. Das Peptid wurde in Diethylether gefällt, abzentrifugiert und anschließend vier Mal mit Ether gewaschen. Der Rückstand wurde mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt, die Produktfraktionen konnten durch das Indol-Signal bei $\lambda = 278$ nm identifiziert werden. Nach anschließender Lyophilisierung konnten 86 mg (0.03 mmol, 28%) als blass gelber Rückstand erhalten werden.

HRMS (ESI): für C₁₄₂H₂₁₆N₃₆O₃₉S²⁺ (M+2 H⁺), ber.: 1540.7868, gef.: 1540.7949.

RT (HPLC): 10%-99% MeCN (30 min): 11.39 min.

[N₃-Gly¹-D-Ala¹⁰, Pli¹⁷=Cat¹⁸]-Foldon (74)

C₁₄₅H₂₁₆N₃₈O₄₁S [3177.57]

Die Verbindung **(74)** wurde mittels Festphasensynthese in 0.1 millimolarem Maßstab entsprechend dem **Festphasenprotokoll I** dargestellt. Die Abspaltung vom Harz sowie die Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen erfolgte mit TFA/H₂O/TIPS/Phenol 95:2:2:1 über einen Zeitraum von 90 Minuten. Das Peptid wurde in Diethylether gefällt, abzentrifugiert und anschließend vier Mal mit Ether gewaschen. Der Rückstand wurde mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt, die Produktfraktionen konnten durch das Indol-Signal bei $\lambda = 278$ nm identifiziert werden. Nach anschließender Lyophilisierung konnten 52 mg (0.02 mmol, 16%) als farbloser Rückstand erhalten werden.

HRMS (ESI): für C₁₄₅H₂₁₉N₃₈O₄₁S³⁺ (M+3 H⁺), ber.: 1060.1975, gef.: 1060.1985.

RT (HPLC): 10%-99% MeCN (30 min): 12.72 min.

[D-Ala¹⁰, D-Phe¹⁷, Pro¹⁸]-Foldon (75)

C₁₅₁H₂₂₄N₃₆O₃₉ [3165.67]

Die Verbindung **(75)** wurde mittels Festphasensynthese in 0.1 millimolarem Maßstab entsprechend dem **Festphasenprotokoll I** dargestellt. Die Abspaltung vom Harz sowie die Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen erfolgte mit TFA/H₂O/TIPS/Phenol 95:2:2:1 über einen Zeitraum von 90 Minuten. Das Peptid wurde in Diethylether gefällt, abzentrifugiert und anschließend vier Mal mit Ether gewaschen. Der Rückstand wurde mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt, die Produktfraktionen konnten durch das Indol-Signal bei $\lambda = 278$ nm identifiziert werden. Nach

anschließender Lyophilisierung konnten 42 mg (0.01 mmol, 13%) als farbloser Rückstand erhalten werden.

HRMS (ESI): für $C_{151}H_{227}N_{36}O_{39}^{3+}$ ($M+3 H^+$), ber.: 1056.2290, gef.: 1056.2338.

RT (HPLC): 10%-99% MeCN (30 min): 13.91 min.

[D-Ala¹⁰, D-Phe¹⁷]-Foldon (76)

$C_{148}H_{220}N_{36}O_{39}$ [3125.63]

Die Verbindung (**76**) wurde mittels Festphasensynthese in 0.1 millimolarem Maßstab entsprechend dem **Festphasenprotokoll I** dargestellt. Die Abspaltung vom Harz sowie die Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen erfolgte mit TFA/H₂O/TIPS/Phenol 95:2:2:1 über einen Zeitraum von 90 Minuten. Das Peptid wurde in Diethylether gefällt, abzentrifugiert und anschließend vier Mal mit Ether gewaschen. Der Rückstand wurde mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt, die Produktfraktionen konnten durch das Indol-Signal bei $\lambda = 278$ nm identifiziert werden. Nach anschließender Lyophilisierung konnten 21 mg (0.01 mmol, 7%) als farbloser Rückstand erhalten werden.

HRMS (ESI): für $C_{148}H_{223}N_{36}O_{39}^{3+}$ ($M+3 H^+$), ber.: 1042.8852, gef.: 1042.8899.

RT (HPLC): 10%-99% MeCN (30 min): 13.49 min.

[D-Ala¹⁰, Btd^{17,18}]-Foldon (77)

$C_{145}H_{218}N_{36}O_{39}S$ [3121.57]

Die Verbindung (**77**) wurde mittels Festphasensynthese in 0.1 millimolarem Maßstab entsprechend dem **Festphasenprotokoll I** dargestellt. Die Abspaltung vom Harz sowie die Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen erfolgte mit TFA/H₂O/TIPS/Phenol 95:2:2:1 über einen Zeitraum von 90 Minuten. Das Peptid wurde in Diethylether gefällt, abzentrifugiert und anschließend vier Mal mit Ether gewaschen. Der Rückstand wurde mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt, die Produktfraktionen konnten durch das Indol-Signal bei $\lambda = 278$ nm identifiziert werden. Nach anschließender Lyophilisierung konnten 33 mg (0.02 mmol, 15%) als farbloser Rückstand erhalten werden.

HRMS (ESI): für $C_{145}H_{220}N_{36}O_{39}S^{2+}$ ($M+2 H^+$), ber.: 1560.8024, gef.: 1560.8103.

RT (HPLC): 10%-99% MeCN (30 min): 11.74 min.

[D-Ala¹⁰, Ala¹⁶, Pli¹⁷=Cat¹⁸]-Foldon (78)

$C_{142}H_{211}N_{35}O_{41}S$ [3096.47]

Die Verbindung (**78**) wurde mittels Festphasensynthese in 0.1 millimolarem Maßstab entsprechend dem **Festphasenprotokoll I** dargestellt. Die Abspaltung vom Harz sowie die Entfernung der

Seitenkettenschutzgruppen erfolgte mit TFA/H₂O/TIPS/Phenol 95:2:2:1 über einen Zeitraum von 90 Minuten. Das Peptid wurde in Diethylether gefällt, abzentrifugiert und anschließend vier Mal mit Ether gewaschen. Der Rückstand wurde mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt, die Produktfraktionen konnten durch das Indol-Signal bei $\lambda = 278$ nm identifiziert werden. Nach anschließender Lyophilisierung konnten 58 mg (0.02 mmol, 19%) als farbloser Rückstand erhalten werden.

HRMS (ESI): für C₁₄₂H₂₁₄N₃₅O₄₁S³⁺ (M+3 H⁺), ber.: 1032.5147, gef.: 1032.5106.

RT (HPLC): 10%-99% MeCN (30 min): 12.60 min.

[D-Ala¹⁰, Pli¹⁷=Cat¹⁸, Ala¹⁹]-Foldon (79)

C₁₄₃H₂₁₆N₃₆O₃₉S [3095.53]

Die Verbindung (79) wurde mittels Festphasensynthese in 0.1 millimolarem Maßstab entsprechend dem **Festphasenprotokoll I** dargestellt. Die Abspaltung vom Harz sowie die Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen erfolgte mit TFA/H₂O/TIPS/Phenol 95:2:2:1 über einen Zeitraum von 90 Minuten. Das Peptid wurde in Diethylether gefällt, abzentrifugiert und anschließend vier Mal mit Ether gewaschen. Der Rückstand wurde mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt, die Produktfraktionen konnten durch das Indol-Signal bei $\lambda = 278$ nm identifiziert werden. Nach anschließender Lyophilisierung konnten 87 mg (0.03 mmol, 28%) als farbloser Rückstand erhalten werden.

HRMS (ESI): für C₁₄₃H₂₁₉N₃₆O₃₉S³⁺ (M+3 H⁺), ber.: 1032.1988, gef.: 1032.2006.

RT (HPLC): 10%-99% MeCN (30 min): 11.80 min.

[D-Ala¹⁰, Ala¹⁶, Pli¹⁷=Cat¹⁸, Ala¹⁹]-Foldon (80)

C₁₄₀H₂₀₉N₃₅O₃₉S [3038.44]

Die Verbindung (80) wurde mittels Festphasensynthese in 0.1 millimolarem Maßstab entsprechend dem **Festphasenprotokoll I** dargestellt. Die Abspaltung vom Harz sowie die Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen erfolgte mit TFA/H₂O/TIPS/Phenol 95:2:2:1 über einen Zeitraum von 90 Minuten. Das Peptid wurde in Diethylether gefällt, abzentrifugiert und anschließend vier Mal mit Ether gewaschen. Der Rückstand wurde mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt, die Produktfraktionen konnten durch das Indol-Signal bei $\lambda = 278$ nm identifiziert werden. Nach anschließender Lyophilisierung konnten 47 mg (0.02 mmol, 15%) als farbloser Rückstand erhalten werden.

HRMS (ESI): für C₁₄₀H₂₁₁N₃₅O₃₉S²⁺ (M+2 H⁺), ber.: 1519.2657, gef.: 1519.2824.

RT (HPLC): 10%-99% MeCN (30 min): 12.58 min.

[wt]-Foldon (81) $C_{142}H_{214}N_{36}O_{41}$ [3081.44]

Die Verbindung **(81)** wurde mittels Festphasensynthese in 0.1 millimolarem Maßstab entsprechend dem **Festphasenprotokoll I** dargestellt. Die Abspaltung vom Harz sowie die Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen erfolgte mit TFA/H₂O/TIPS/Phenol 95:2:2:1 über einen Zeitraum von 90 Minuten. Das Peptid wurde in Diethylether gefällt, abzentrifugiert und anschließend vier Mal mit Ether gewaschen. Der Rückstand wurde mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt, die Produktfraktionen konnten durch das Indol-Signal bei $\lambda = 278$ nm identifiziert werden. Nach anschließender Lyophilisierung konnten 25 mg (0.01 mmol, 8%) als farbloser Rückstand erhalten werden.

HRMS (ESI): für $C_{142}H_{217}N_{36}O_{41}^{3+}$ ($M+3 H^+$), ber.: 1027.8673, gef.: 1027.8661.

RT (HPLC): 10%-99% MeCN (30 min): 11.77 min.

[D-Ala¹⁰]-Foldon (82) $C_{143}H_{216}N_{36}O_{41}$ [3095.46]

Die Verbindung **(82)** wurde mittels Festphasensynthese in 0.1 millimolarem Maßstab entsprechend dem **Festphasenprotokoll I** dargestellt. Die Abspaltung vom Harz sowie die Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen erfolgte mit TFA/H₂O/TIPS/Phenol 95:2:2:1 über einen Zeitraum von 90 Minuten. Das Peptid wurde in Diethylether gefällt, abzentrifugiert und anschließend vier Mal mit Ether gewaschen. Der Rückstand wurde mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt, die Produktfraktionen konnten durch das Indol-Signal bei $\lambda = 278$ nm identifiziert werden. Nach anschließender Lyophilisierung konnten 20 mg (0.01 mmol, 6%) als farbloser Rückstand erhalten werden.

HRMS (ESI): für $C_{143}H_{218}N_{36}O_{41}^{2+}$ ($M+2 H^+$), ber.: 1548.3051, gef.: 1548.3146.

RT (HPLC): 10%-99% MeCN (30 min): 10.77 min.

[Pli¹⁷=Cat¹⁸]-Foldon (83) $C_{144}H_{216}N_{36}O_{41}S$ [3139.54]

Die Verbindung **(83)** wurde mittels Festphasensynthese in 0.1 millimolarem Maßstab entsprechend dem **Festphasenprotokoll I** dargestellt. Die Abspaltung vom Harz sowie die Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen erfolgte mit TFA/H₂O/TIPS/Phenol 95:2:2:1 über einen Zeitraum von 90 Minuten. Das Peptid wurde in Diethylether gefällt, abzentrifugiert und anschließend vier Mal mit Ether gewaschen. Der Rückstand wurde mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt, die Produktfraktionen konnten durch das Indol-Signal bei $\lambda = 278$ nm identifiziert werden. Nach

anschließender Lyophilisierung konnten 38 mg (0.01 mmol, 12%) als farbloser Rückstand erhalten werden.

HRMS (ESI): für $C_{144}H_{218}N_{36}O_{41}S^{2+}$ ($M+2 H^+$), ber.: 1569.7895, gef.: 1569.7825.

RT (HPLC): 10%-99% MeCN (30 min): 10.73 min.

7 Literaturverzeichnis

- [1] S. B. H. Kent, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 338.
- [2] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemie*, Spektrum, Heidelberg, **2003**.
- [3] H.-D. Jakubke, *Peptide: Chemie und Biologie*, Spektrum, Heidelberg, **1996**.
- [4] G. N. Ramachandran, C. Ramakrishnan, V. Sasisekharan, *J. Mol. Biol.* **1963**, 7, 95.
- [5] H. R. Horton, L. A. Moran, K. G. Scrimgeour, M. D. Perry, J. D. Rawn, *Biochemie*, Pearson Studium, München, **2008**.
- [6] P. N. Lewis, F. A. Momany, H. A. Scheraga, *PNAS* **1971**, 68, 2293.
- [7] C. M. Venkatachalam, *Biopolymers* **1968**, 6, 1425.
- [8] J. A. Smith, L. G. Pease, *CRC Crit. Rev. Biochem.* **1980**, 8, 315.
- [9] R. L. Stanfield, T. M. Fieser, R. A. Lerner, I. A. Wilson, *Science* **1990**, 248, 712.
- [10] G. R. Marshall, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1992**, 2, 904.
- [11] E. G. Hutchinson, J. E. Thornton, *Protein Science* **1994**, 3, 2207.
- [12] K. S. Rotondi, L. M. Gierasch, *Biopolymers* **2006**, 84, 13.
- [13] E. G. Hutchinson, J. M. Thornton, *Protein Sci.* **1994**, 3, 2207.
- [14] K. Brickmann, Z. Yuan, I. Sethson, P. Somfai, J. Kihlberg, *Chem. Eur. J.* **1999**, 5, 2241.
- [15] H. Kessler, *Angewandte Chemie* **1982**, 94, 509.
- [16] H. Duddle, W. Dietrich, G. Toth, *Structure Elucidation by Modern NMR*, Steinkopf, Darmstadt, **1998**.
- [17] H. Kessler, C. Griesinger, J. Zarbock, H. R. Loosli, *J. Magn. Reson.* **1984**, 57, 331.
- [18] M. F. Summers, L. G. Marzilli, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 4285.
- [19] T. D. W. Claridge, *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, Elsevier, Amsterdam, **2005**.
- [20] A. Bax, D. G. Davis, *J. Magn. Reson.* **1985**, 63, 207.
- [21] D. I. Hoult, *J. Magn. Reson.* **1976**, 21, 337.
- [22] D. Callihan, J. West, S. Kumar, B. I. Schweitzer, T. M. Logan, *J. Magn. Reson., Ser. B* **1996**, 112, 82.
- [23] M. Piotto, V. Saudek, V. Slenar, *J. Biomol. NMR* **1992**, 2, 661.
- [24] V. Sklenar, M. Piotto, R. Leppik, V. Saudek, *J. Magn. Reson., Ser. A* **1993**, 102, 241.
- [25] D. Marion, M. Ikura, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1989**, 84, 425.
- [26] D. Claudio, S. Gideon, B. Jean-Marc, P. Teodor, *Magn. Reson. Chem.* **1999**, 37, 7.
- [27] P. Teodor, A. Pere, S.-F. Francisco, V. Albert, *Magn. Reson. Chem.* **1998**, 36, 245.
- [28] O. Jardetzky, *Biochim. Biophys. Acta* **1980**, 621, 227.
- [29] Y. A. Bara, A. Friedrich, H. Kessler, M. Molter, *Chem. Ber.* **1978**, 111, 1045.
- [30] M. Karplus, *J. Chem. Phys.* **1959**, 30, 11.
- [31] M. Karplus, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2870.
- [32] V. F. Bystrov, *Prog. NMR Spec.* **1976**, 10, 41.
- [33] F. Löhr, M. Blümel, J. M. Schmidt, H. Rüterjans, *J. Biomol. NMR* **1997**, 10, 107.
- [34] A. De Marco, M. Llinas, *Biochemistry* **1979**, 18, 3846.
- [35] V. F. Bystrov, A. S. Arseniev, Y. D. Gavrilov, *J. Magn. Reson.* **1978**, 30, 151.
- [36] M. Hesse, H. Meier, B. Zehe, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Thieme, Stuttgart, **2005**.
- [37] *Thieme Römpp Online: Karplus Beziehung*, Georg Thieme Verlag, **2009**.
- [38] H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1982**, 21, 512.
- [39] R. Hirschmann, K. C. Nicolaou, S. Pietranico, E. M. Leahy, J. Salvino, B. Arison, M. A. Cichy, P. G. Spoors, W. C. Shakespeare, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 115, 12550.
- [40] V. J. Hruby, F. Al-Obeidi, W. Kazmierski, *Biochem J.* **1990**, 268, 249.
- [41] A. S. Ripka, D. H. Rich, *Curr Opin Chem Biol* **1998**, 2, 441.
- [42] G. D. Rose, L. M. Gierasch, J. A. Smith, *Adv. Protein Chem.* **1985**, 37, 109.
- [43] J. B. Ball, P. F. Alewood, *J. Mol. Recognit.* **1990**, 3, 55.

- [44] G. L. Olson, M. E. Voss, D. E. Hill, M. Kahn, V. S. Madison, C. M. Cook, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *112*, 323.
- [45] B. Gardner, H. Nakanishi, M. Kahn, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 3433.
- [46] A. J. Souers, J. A. Ellman, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 7431.
- [47] R. M. Freidinger, D. S. Schwenk Perlow, D. F. Veber, *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 104.
- [48] R. M. Freidinger, D. F. Veber, D. S. Perlow, J. R. Brooks, R. Saperstein, *Science* **1980**, *210*, 656.
- [49] U. Nagai, K. Sato, *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 647.
- [50] M. J. Genin, W. B. Gleason, R. L. Johnson, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 860.
- [51] M. G. Hinds, N. G. Richards, J. A. Robinson, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1988**, 1447.
- [52] U. Schopfer, M. Stahl, T. Brandl, R. W. Hoffmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 1745.
- [53] J. Cluzeau, W. D. Lubell, *Biopolymers* **2005**, *80*, 98.
- [54] A. Geyer, D. Bockelmann, K. Weissenbach, H. Fischer, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 477.
- [55] A. Geyer, F. Moser, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 1113.
- [56] P. Tremmel, A. Geyer, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8548.
- [57] P. Tremmel, A. Geyer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *116*, 5913.
- [58] D. Kohr, *Dissertationsschrift* **2008**.
- [59] R. Hörger, A. Geyer, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 4491.
- [60] H. Seger, A. Geyer, *Synthesis* **2006**, *19*, 3224.
- [61] M. Haack, S. Enck, H. Seger, A. Geyer, A. G. Beck-Sicking, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8326.
- [62] P. Tremmel, *Dissertationsschrift* **2004**.
- [63] C. Klotz, *Diplomarbeit* **2009**.
- [64] J. D. Williams, V. P. Kamath, P. E. Morris, L. B. Townsend, *Org. Synth.* **2005**, *82*, 75.
- [65] J. D. More, N. S. Finney, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3001.
- [66] M. Frigerio, M. Santagostino, S. Sputore, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4537.
- [67] D. B. Dess, J. C. Martin, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7277.
- [68] B. Eckhardt, *Diplomarbeit* **2006**.
- [69] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149.
- [70] G. Barany, N. Kneib-Cordonier, D. G. Mullen, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1987**, *30*, 705.
- [71] S. B. H. Kent, *Ann. Rev. Biochem.* **1988**, *57*, 957.
- [72] G. B. Fields, R. L. Noble, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *35*, 161.
- [73] T. Schrader, *Ringvorlesung "Chemisch Biologische Synthese"*.
- [74] F. Weygand, A. Prox, L. Schmidhammer, W. König, *Angew. Chem.* **1963**, *75*, 282.
- [75] C. van der Auwera, M. Anteurns, *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1987**, *29*, 574.
- [76] E. Frérot, J. Coste, J. Poncet, P. Jouin, B. Castro, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 2815.
- [77] R. Brückner, *Reaktionsmechanismen*, Spektrum, Akad. Verlag, Heidelberg; Berlin, **2003**.
- [78] C. M. Deber, V. Madison, E. R. Blout, *Acc. Chem. Res.* **1976**, *9*, 106.
- [79] D. F. Veber, R. G. Strachan, S. J. Bergstrand, F. W. Holly, C. F. Homnick, R. Hirschmann, M. L. Torchiana, R. Saperslein, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 2367.
- [80] D. F. Veber, F. W. Holly, R. F. Nutt, S. J. Bergstrand, S. F. Brady, R. Hirschmann, M. S. Glitzer, S. Saperstein, *Nature* **1979**, *280*, 512.
- [81] R. F. Nutt, D. F. Veber, R. Saperstein, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 6539.
- [82] P. Tremmel, A. Geyer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5789.
- [83] P. Athanassopoulos, K. Barlos, D. Gatos, O. Hatzi, C. Tzavara, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 5645.
- [84] M. T. Cung, M. Marraud, *Biopolymers* **1982**, 953.
- [85] K. G. R. Pachler, *Spectrochim. Acta* **1964**, *20*, 581.
- [86] A. C. Bach, J. A. Markwalder, W. C. Ripka, *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1991**, *38*, 314.
- [87] K. Sato, U. Nagai, *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1* **1986**, 1231.
- [88] G. M. Rishton, N. K. Harn, S. J. Cripps, S.-L. Chiang, C. Mikos, P. Cardarelli, T. J. Lobl, F. Gorcsan, M. Moscinski, N. G. J. Delaet, S. M. Walker, *Lett. Pept. Sci.* **1996**, *3*, 37.
- [89] R. Haubner, W. Schmitt, G. Holzemann, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7881.

- [90] F. A. Etzkorn, T. Guo, M. A. Lipton, S. D. Goldberg, P. A. Bartlett, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 10412.
- [91] U. Nagai, K. Sato, R. Nakamura, R. Kato, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 3577.
- [92] Homepage Chem-Impex International Inc., **2009**.
- [93] J. M. Scholtz, P. A. Bartlett, *Synthesis* **1989**, 542.
- [94] S. Eckhardt, *Dissertationsschrift* **2009**.
- [95] J. E. Baldwin, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1976**, 734.
- [96] J. E. Baldwin, R. C. Thomas, L. I. Kruse, L. Silberman, *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 3846.
- [97] J. E. Baldwin, M. J. Lusch, *Tetrahedron* **1982**, *38*, 2939.
- [98] C. D. Johnson, *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*, 476.
- [99] P. Brazeau, W. Vale, R. Burgus, N. Ling, M. Butcher, J. Rivier, R. Guillemin, *Science* **1973**, *179*, 77.
- [100] S. Reichlin, *N. Engl. J. Med.* **1983**, 1495.
- [101] S. Reichlin, *N. Engl. J. Med.* **1983**, 1556.
- [102] N. Delesque, L. Buscail, J. P. Estève, N. Saint-Laurent, C. Muller, G. Weckbecker, C. Bruns, N. Vaysse, C. Susini, *Cancer Res.* **1997**, *57*.
- [103] S. Froidevaux, A. N. Eberle, *Biopolymers* **2002**, *66*, 161.
- [104] J. Epelbaum, *Prog. Neurobiol.* **1986**, *27*, 63.
- [105] R. Guillemin, J. E. Gerich, *Annu. Rev. Med.* **1976**, *27*, 379.
- [106] Y. C. Patel, *Neuroendocrinol.* **1999**, *20*, 157.
- [107] R. M. Freidinger, D. Schwenk-Perlow, W. C. Randall, R. Saperstein, B. H. Arison, D. F. Veber, *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1984**, *23*, 142.
- [108] W. Bauer, U. Briner, W. Doepfner, R. Haller, R. Huguenin, P. Marbach, T. J. Petcher, *Life Sci.* **1982**, *31*, 1133.
- [109] P. Marbach, U. Briner, M. Lemaire, A. Schweizer, T. Terasaki, *Metab. Clin. Exp.* **1992**, *41*, 7.
- [110] A. Janecka, M. Zubrzycka, T. Janecki, *J. Pept. Res.* **2001**, *58*, 91.
- [111] E. v. Strauss, M. Viitanen, D. D. Ronchi, B. Winblad, L. Fratiglioni, *Arch. Neurol.* **1999**, *56*, 587.
- [112] R. Brookmeyer, S. Gray, C. Kawas, *Am. J. Public Health* **1998**, *88*, 1337.
- [113] D. J. Selkoe, *Physiol. Rev.* **2001**, *81*, 741.
- [114] E. G. Zinser, T. Hartmann, M. O. W. Grimm, *BBA* **2007**, *1768*, 1991.
- [115] J. T. Jarrett, E. P. Berger, P. T. Lansbury, Jr., *Biochemistry* **1993**, *32*, 4693.
- [116] D. Burdick, B. Soreghan, M. Kwon, J. Kosmoski, M. Knauer, A. Henschen, J. Yates, C. Cotman, C. Glabe, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 546.
- [117] R. Riek, P. Guntert, H. Dobeli, B. Wipf, K. Wüthrich, *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 5930.
- [118] A. T. Petkova, Y. Ishii, J. J. Balbach, O. N. Antzutkin, R. D. Leapman, F. Delaglio, R. Tycko, *PNAS* **2002**, *99*, 16742.
- [119] T. Lührs, C. Ritter, M. Adrian, D. Riek-Loher, B. Bohrmann, H. Döbeli, D. Schubert, R. Riek, *PNAS* **2005**, *102*, 17342.
- [120] R. Tycko, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, *14*, 96.
- [121] D. A. Kirschner, C. Abraham, D. J. Selkoe, *PNAS* **1986**, *83*, 503.
- [122] J. J. Balbach, A. T. Petkova, N. A. Oyler, O. N. Antzutkin, D. J. Gordon, S. C. Meredith, R. Tycko, *Biophys. J.* **2002**, *83*, 1205.
- [123] S. H. Gellman, *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 173.
- [124] D. Seebach, M. Overhand, F. N. M. Kühnle, B. Martinoni, L. Oberer, U. Hommel, H. Widmer, *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 913.
- [125] D. Seebach, P. E. Ciceri, M. Overhand, B. Jaun, D. Rigo, L. Oberer, U. Hommel, R. Amstutz, H. Widmer, *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 2043.
- [126] G. P. Dado, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1054.
- [127] S. Krauthauser, L. A. Christianson, D. R. Powell, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11719.
- [128] S. Chandrasekhar, B. N. Babu, A. Prabhakar, A. Sudhakar, M. S. Reddy, M. U. Kiranb, B. Jagadeesh, *Chem. Commun.* **2006**, 1548.

- [129] Y. Suhara, M. Kurihara, A. Kittaka, Y. Ichikawa, *Tetrahedron* **2006**, 62, 8207.
- [130] P. N. Wyrembak, A. D. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 4566.
- [131] D. Fischer, E. Loos, A. Geyer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 816.
- [132] S. P. Boudko, S. V. Strelkov, J. Engel, J. Stetefeld, *J. Mol. Biol.* **2004**, 339, 927.
- [133] A. Fokine, A. J. Battisti, V. A. Kostyuchenko, L. W. Black, M. G. Rossmann, *J. Struct. Biol.* **2006**, 154, 255.
- [134] S. V. Strelkov, Y. Tao, M. G. Rossmann, L. P. Kurochkina, M. M. Shneider, V. V. Mesyanzhinov, *Virology* **1996**, 219, 190.
- [135] M. P. Conley, W. B. Wood, *PNAS* **1975**, 72, 3701.
- [136] Y. Tao, S. V. Strelkov, V. V. Mesyanzhinov, M. G. Rossmann, *Structure* **1997**, 5, 789.
- [137] A. V. Letarov, Y. Y. Londer, S. P. Boudko, V. V. Mesyanzhinov, *Biochemistry (Moscow)* **1999**, 64, 817.
- [138] S. P. Boudko, Y. Y. Londer, A. V. Letarov, N. V. Sernova, J. Engel, V. V. Mesyanzhinov, *Eur. J. Biochem.* **2002**, 269, 833.
- [139] V. P. Efimov, I. V. Nepluev, B. N. Sobolev, T. G. Zurabishvili, T. Schulthess, A. Lustig, J. Engel, M. Haener, U. Aebi, S. Y. Venyaminov, S. A. Potekhin, V. V. Mesyanzhinov, *J. Mol. Biol.* **1994**, 242, 470.
- [140] S. Meier, S. Güthe, T. Kiefhaber, S. Grzesiek, *J. Mol. Biol.* **2004**, 344, 1051.
- [141] S. Güthe, L. Kapinos, A. Möglich, S. Meier, S. Grzesiek, T. Kiefhaber, *J. Mol. Biol.* **2004**, 337, 905.
- [142] S. Frank, R. A. Kammerer, D. Mechling, T. Schulthess, R. Landwehr, J. Bann, Y. Guo, A. Lustig, H. P. Bächinger, J. Engel, *J. Mol. Biol.* **2001**, 308, 1081.
- [143] J. Stetefeld, S. Frank, M. Jenny, T. Schulthess, R. A. Kammerer, S. Boudko, R. Landwehr, K. Okuyama, J. Engel, *Structure* **2003**, 11, 339.
- [144] X. Yang, J. Lee, E. M. Mahony, P. D. Kwong, R. Wyatt, J. Sodroski, *J. Virol.* **2002**, 76, 4634.
- [145] L. Sissoeff, M. Mousli, P. England, C. Tuffereau, *J. Gen. Virol.* **2005**, 86, 2543.
- [146] K. Papanikolopoulou, S. Teixeira, H. Belrhali, V. T. Forsyth, A. Mitraki, M. J. v. Raaij, *J. Mol. Biol.* **2004**, 342, 219.
- [147] R. Seckler, *Mechanisms of Protein Folding*, Oxford University Press, Oxford, **2000**.
- [148] J. Habazettl, A. Reiner, T. Kiefhaber, *J. Mol. Biol.* **2009**, 389, 103.
- [149] J. L. Laue, C. G. Fields, G. B. Fields, *Lett. Pept. Sci.* **1994**, 1, 197.
- [150] M. Mergler, F. Dick, B. Sax, P. Weiler, T. Vorherr, *J. Pept. Sci.* **2003**, 9, 36.
- [151] M. Mergler, F. Dick, B. Sax, C. Stähelin, T. Vorherr, *J. Pept. Sci.* **2003**, 9, 518.
- [152] M. Mergler, F. Dick, *J. Pept. Sci.* **2005**, 11, 650.
- [153] M. Quibell, D. Owen, L. C. Packman, T. Johnson, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 2343.
- [154] L. C. Packman, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 7523.
- [155] F. I. Valiyaveetil, M. Leonetti, T. W. Muir, R. MacKinnon, *Science* **2006**, 314, 1004.
- [156] L. A. Carpino, H. Shroff, S. A. Triolo, E.-S. M. E. Mansour, H. Wenschuh, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 7829.
- [157] E. Atherton, R. C. Sheppard, J. D. Wade, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1983**, 1060.
- [158] R. A. Berg, D. J. Prockop, *Biochem. Biophys. Res. Commun* **1973**, 52, 115.
- [159] R. Berisio, A. D. Simone, A. Ruggiero, R. Improta, L. Vitagliano, *J. Pept. Sci.* **2009**, 15, 131.
- [160] B. Brodsky, G. Thiagarajan, B. Madhan, K. Kar, *Biopolymers* **2008**, 89, 345.
- [161] M. D. Shoulders, R. T. Raines, *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, 78, 929.
- [162] M. L. DeRider, S. J. Wilkens, M. J. Waddell, L. E. Bretscher, F. Weinhold, R. T. Raines, J. L. Markley, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 2497.
- [163] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2004.
- [164] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2596.
- [165] V. O. Rodionov, V. V. Fokin, M. G. Finn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 2210.
- [166] L. Zhang, X. Chen, P. Xue, H. H. Y. Sun, I. D. Williams, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, G. Jia, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 15998.

- [167] S. Reitz, M. Cebi, P. Reiß, G. Studnik, U. Linne, U. Koert, L.-O. Essen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4853.
- [168] K. Yamada, M. Unno, K. Kobayashi, H. Oku, H. Yamamura, S. Araki, H. Matsumoto, R. Katakai, M. Kawai, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12684.
- [169] A. Stern, W. A. Gibbons, L. C. Craig, *PNAS* **1968**, *61*, 734.
- [170] J. Muhuhi, M. R. Spaller, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 5515.
- [171] A. Reiner, T. Kiefhaber, **2009**.
- [172] B. Rita, G. Vincenzo, V. Luigi, Z. Adriana, *Biopolymers* **2004**, *73*, 682.
- [173] H. W. Große, L. O. Essen, **2009**.
- [174] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512.
- [175] I. C. Jones, G. J. Sharman, J. Pidgeon, *Magn. Reson. Chem.* **2005**, *43*, 497.
- [176] J. D. Williams, V. P. Kamath, P. E. Morris, L. B. Townsend, *Org. Synth.*, *82*, 75.

Danksagung

Zum Ende möchte ich mich bei all denen Bedanken, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Ich danke der Evonik-Stiftung für die zweijährige Finanzierung meiner Arbeit im Rahmen des Werner-Schwarze-Stipendiums.

Frau Dr. X. Xie, Herrn Dr. R. Wagner, Herrn A. Mbonimana und Herrn G. Häde danke ich für die Messungen an den Hochfeldgeräten sowie für die Überlassung der Geräte zur Eigenmessung.

Der massenspektrometrischen Abteilung um Herrn Dr. K. Steinbach danke ich für die Aufnahme der Massenspektren. Mein besonderer Dank gilt hierbei Natalia Fritzler und Jan Bamberger die stets geduldig und sehr zuverlässig die Screenings der HPLC-Läufe durchgeführt haben.

Dr. Uwe Linne gilt mein besonderer Dank für die präparative Aufreinigung sehr vieler Peptide mittels RP-HPLC sowie für sein fachkundiges Wissen bei allen möglichen- und unmöglichen Fragestellungen zu HPLC und ESI.

Den entsprechenden Serviceabteilungen danke ich für die Aufnahme der IR-Spektren und für die Durchführung der CHN-Analysen – Entschuldigung, wann immer ich den zweiten Zettel vergessen habe.

Ich danke Wolfgang Große für seine hilfreichen Tipps betreffend Pymol sowie für die angenehme Zusammenarbeit – insbesondere für seine Geduld, falls es mal wieder etwas schneller gehen musste.

Vielen Dank an Dr. Simon Reitz, für das Korrekturlesen des Abschnitts der Proteinkristallstrukturen sowie für die netten Canasta-Abende.

Mein besonderer Dank gilt den Arbeitsgruppen Geyer und Oberthür für das angenehme Arbeitsklima sowie die Hilfestellung bei allen chemischen- wie nichtchemischen Fragen.

Ich danke Ferdinand Boshold, dass er eigentlich immer für die eine oder andere Frotzelei zu haben war, was den Arbeitsalltag sehr aufgewertet hat! Weiterhin Danke ich ihm für alle Verbindungen die er für mich in den letzten Jahren hergestellt hat.

Ich danke meine Namensvetterin Sonja Eckhardt, nicht verwandt und nicht verschwägert, für die vielen Hilfestellungen seitens der Formatierung dieser Arbeit. So, jetzt bist du mich zuletzt doch noch losgeworden – nach Lausanne reise ich dir nicht hinterher!

Sebastian Enck, unserer Dauervertretung des Arbeitskreises von 7:30 bis 24:00, danke ich für seine stets hilfsbereite Art und das Korrekturlesen.

Weiterhin möchte ich Anja Fischer sowie Yana Raeva für die nette Zusammenarbeit sowie deren tatkräftige Unterstützung danken.

Christoph Klotz, gestern noch Vertiefungsstudent, heute selbständiger Forscher ... man, hab' ich lange gebraucht ... vielen Dank für die Korrektur meiner Arbeit und das Ertragen meines Musikgeschmacks.

Ich danke Miriam Lauz für die zahlreichen Tipps und Tricks betreffend Word und den Ansporn endlich mit dieser Arbeit fertig zu werden.

Michael Marsch danke ich für die geduldige und stets professionelle Art zu erklären, dass die Kristallisation wohl nicht so verlaufen ist, wie sie eigentlich sollte. Weiterhin danke ich ihm für die Aufnahme aller Kristallstrukturdaten, deren Kristalle so *naja* waren. Nicht zuletzt danke ich für die kompetente Hilfestellung bei allen Netzwerk- und PC-Problemen.

Mein Dank gilt Dr. Markus Oberthür für das Korrigieren dieser Arbeit und seine hilfreichen Anmerkungen sowie für die angenehmen Unterhaltungen am frühen Morgen zur täglichen Kaffeerrunde.

Radostan Riedel, dem großen Dr. House Fan, danke ich für das eine oder andere gute serienspezifische Gespräch.

Mein Dank gilt Andreas Roeder, mit dem ich beinahe zwei Jahre lang das Labor teilen durfte. Weiterhin vielen Dank für das Korrekturlesen meiner Arbeit. Mal schauen, vielleicht schaffst du es noch, dass irgendwann eine Variante der Kohr'schen Krankheit nach dir benannt wird.

Susanne Schellenberg, unserer Sekretärin und heimlichen Herrscherin auf A6, danke ich für die Einweisung in die tiefen Geheimnisse der Telefonanlage und für die vielen lustigen Unterhaltungen.

Timm Schlosser danke ich für seine stets fachkundige Beratung seitens aller erdenklicher Grafikprogramme sowie für seine angenehm ruhige Art und seinem trockenen Humor.

Peter Schüler danke ich für den Beweis, dass man so langsam essen kann, dass andere bereit wieder hunger bekommen – bald stresst dich keiner mehr beim Essen.

Ich danke Clemens Schwörer, dem Querstreifenträger schlechthin, für seine schwarzhumorige Sicht der Dinge, die er zur Erheiterung des Öfteren mit mir geteilt hat.

Ich danke Felix Weiher, dem Mann mit dem Lachen, dass über ganze Stockwerke hallt für die netten Gespräche, wir sehen uns beim nächsten Halbmarathon.

Ralph Wieneke, dem lebenden Handbuch der Namensreaktionen, danke ich, dass er es zum Schluss wenigstens versucht hat, die Eppendorf-Pipette regelmäßig zurückzubringen.

Ich danke Anita Jansen und Nikolas Bugdahn für ihr tatkräftiges Mitwirken in den Arbeitsgruppen Geyer und Oberthür.

Mein Dank gilt auch den Diplomanten und Bachelor-Studenten der Arbeitskreise Geyer und Oberthür sowie allen nicht erwähnten Studierenden und Mitarbeitern am Fachbereich Chemie für ihre Hilfe.

Ich danke Dr. Rolf Hörger, meinem ehemaligen Labornachbarn und geschätzten „Abgelaufenes-Bier-Anbieter“ für die sehr lustige gemeinsame Laborzeit.

Dr. Dominik Kohr, dem Erfinder der Kohrschen Krankheit sowie einem ebenbürtigen Simpsons-Kenner, danke ich für die sehr unterhaltsamen Abende.

Meinem ehemaligen Labornachbarn Dr. Markus Pfitzenmaier möchte ich nur sagen: Moleküle, Spektren, Manuskripte...Urlaub, Urlaub!

Dr. Harald Seger danke ich für die Einführung in die Welt der bayrischen Biersorten und den Beweis, dass auch ein Bayer beim Fassanstechen mal daneben schlägt.

Zuletzt gilt mein Dank all denen, die mich außerhalb des universitären Alltags nach Möglichkeit unterstützt haben. Ganz besonderer Dank gilt hierbei meinen Eltern, die mein Studium finanziert und mich auch darüber hinaus unterstützt haben.

Vor allen andern aber möchte ich meiner Judith danken, die immer für mich da war und ohne die diese Arbeit in der vorliegenden Form nicht möglich gewesen wäre.